

Die proteasomale Homöostase – Dynamik der Biogenese und Turnover des humanen 20S Proteasoms

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat)

im Fach Biologie
eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Diplom-Biologin Sylvia Heink
geboren am 08.09.1975 in Leipzig

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-M. Kloetzel
2. Prof. Dr. Burkhardt Dahlmann
3. Prof. Dr. Wolfgang Lockau

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2005

Zusammenfassung

Das multimere, proteolytische 20S-Proteasom spielt im Komplex mit seinen 19S-Regulatoren als 26S-Proteasom eine zentrale Rolle beim Proteinabbau und der Generierung von Antigenen für die adaptive zelluläre Immunantwort. Die proteolytische Aktivität des konstitutiven 20S-Proteasoms wird durch die katalytischen Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ vermittelt. Im Verlauf einer Immunantwort wird durch Interferon- γ (IFN γ) die Expression eines alternativen 20S-Proteasom-Typs mit den Immununtereinheiten $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL-1) und $\beta 5i$ (LMP7) induziert. Immunoproteasomen unterstützen eine effiziente Prozessierung von MHC I-präsentierten Antigenen und damit eine effektive Immunabwehr gegen infizierte oder maligne entartete Zellen durch cytotoxische T-Zellen.

Sowohl konstitutive als auch Immunoproteasomen werden exklusiv *de novo* über komplexe, bisher nur unvollständig verstandene Biogenese-Prozesse formiert. Die initialen Schritte der Proteasom-Formation, die bisher weitgehend unbekannt sind, wurden in einem Teil der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Etablierung einer Methode zur Isolation früher proteasomaler Assemblierungsintermediate (EPIs) führte zur Identifizierung von EPI-assoziierten, möglicherweise akzessorischen Chaperonen wie HSP90 und 14-3-3.

Die Formation eukaryotischer 20S-Proteasomen bedarf der Assistenz verschiedener Hilfsfaktoren wie dem Proteasom-Maturierungsprotein POMP, welches ausschließlich als Komponente von Precursorkomplexen beschrieben wurde. Sobald das naszierende Proteasom vollständig gereift ist, stellt POMP dessen erstes Substrat dar. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass sich die Biogenese von konstitutiven bzw. Immunoproteasomen hinsichtlich der Maturierungskinetik unterscheidet. Es wurde nachgewiesen, dass POMP auch für die Immunoproteasom-Reifung von Bedeutung ist und direkt mit der $\beta 5i$ -Immununtereinheit LMP7 interagiert. Nach einer IFN γ -Stimulation humaner Zellen werden sowohl die Immununtereinheiten als auch POMP verstärkt exprimiert. Das molekulare Zusammenspiel von POMP und LMP7 bewirkt eine schnellere Maturierung von Immuno-Precursorkomplexen im Vergleich zu konstitutiven Vorläuferkomplexen. Infolgedessen unterliegt der Maturierungsfaktor auch einem schnelleren Abbau. Die Colonicarcinom-Zelllinie Rko exprimiert auch nach einer IFN γ -Stimulation ausschließlich die nicht funktionelle $\beta 5i$ -Variante LMP7_E1. Es konnte nachgewiesen werden, dass nur LMP7_E2 die schnelle Degradation von POMP vermittelt, während die LMP7_E1-Variante mit einer anderen Prosequenz nicht in Immuno-Precursorkomplexe inkorporiert wird. Somit führt die fehlende Expression von LMP7_E2 in Rko-Zellen zu einer Immunoproteasom-Defizienz, was eine mögliche Immunevasions-Strategie von Tumorzellen darstellt. Die forcierte Biogenese ist eine intrinsisch regulierte Eigenschaft von Immuno-Precursorkomplexen und damit unabhängig von weiteren, cytokin-induzierten Faktoren.

Ein weiteres wichtiges Resultat der vorliegenden Arbeit ist die unterschiedliche Stabilität

beider humaner 20S-Typen. Immunoproteasomen sind signifikant kurzlebiger als konstitutive 20S-Proteasomen. Auch diese Eigenschaft ist unabhängig von weiteren IFN γ -induzierten Proteinen. Somit werden Immunoproteasomen sowohl signifikant schneller *de novo* formiert als auch mit einer drastisch kürzeren Halbwertszeit zügiger wieder abgebaut als konstitutive 20S-Proteasomen und besitzen damit typische Eigenschaften cytokin-modulierter Proteine. Ihre Formation ist eine gezielt regulierte, transiente Antwort. Damit stellt die Induktion der Immunoproteasom-Formation ein effizientes Instrument zur schnellen Reaktion auf sich verändernde immunologische Herausforderungen wie z.B. eine Infektion dar. Nach einer wirksamen Immunantwort erlaubt die geringere Stabilität von Immunoproteasomen eine schnelle Rückkehr zur standardmäßigen Expression von konstitutiven 20S-Proteasomen.

Schlagworte: Proteasom, Immunoproteasom, POMP, LMP7, Interferon_gamma, Assemblierung, Prozessierung, Maturierung, Proteasom-Stabilität, Halbwertszeit, MHC Klasse I - Antigene, Immunantwort

Abstract

In complex with its 19S regulatory complexes the multimeric proteolytic 20S proteasome plays a crucial role in protein degradation and generation of antigens for the adaptive cellular immune response. The proteolytic activity of the constitutive 20S proteasome is provided by the catalytic subunits $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 5$. In the course of an infection interferon γ (IFN γ) induces the expression of an alternative 20S proteasome type with the immunosubunits $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL-1) und $\beta 5i$ (LMP7). Immunoproteasomes support a more efficient processing of MHC I-presented antigens and thus an effective immune response against infected or malignant cells by cytotoxic T-cells.

Both constitutive and immunoproteasomes are exclusively formed *de novo* by a complex and not well understood biogenesis program. The largely unknown initial steps in the proteasome formation have been analyzed in one part of this thesis. An established method for the isolation of 'early proteasome assembly intermediates' (EPIs) resulted in the identification of the EPI-associated, potentially accessory chaperones HSP90 and 14-3-3.

The formation of eukaryotic 20S proteasomes requires the assistance of accessory factors like the proteasome maturation protein POMP, that have been solely described as a component of precursor complexes. As soon as the nascent proteasome has fully matured POMP is its first substrate. The described experiments could demonstrate for the first time that the biogenesis of constitutive and immunoproteasomes differ in their maturation kinetics. It could be proven that POMP is essentially important for the immunoproteasome maturation and interacts directly with the immunosubunit $\beta 5i$ / LMP7. Following an IFN γ stimulation human cells increasingly express immunosubunits as well as POMP. The molecular interplay of POMP and LMP7 provokes an accelerated maturation of immunoprecursors compared to constitutive precursor complexes. Consequently the maturation protein becomes subject to a faster degradation. The colon carcinoma cell line Rko expresses exclusively the non-functional $\beta 5i$ -variant LMP7_E1 even after IFN γ stimulation. It could be demonstrated that only LMP7_E2 causes the rapid degradation of POMP, whereas the LMP7_E1 variant bearing another prosequence is not incorporated into nascent precursor complexes of the immunoproteasome. Thus, the missing expression of LMP7_E2 in Rko cells causes immunoproteasome deficiency, that illustrates a possible immune evasion strategy of tumor cells. The advanced biogenesis is an intrinsically regulated characteristic of immunoprecursors and consequently independent of other cytokine induced factors.

Another fundamental result of this work is the differential stability of both human proteasome types. Immunoproteasomes are significantly less stable than constitutive 20S proteasomes. This feature is independent of other IFN γ -induced proteins. Thus, immunoproteasomes are not only considerably faster formed up, but also decomposed with a drastic shortened half-life compared to constitutive 20S proteasomes, showing typical attributes of proteins modulated by cytokines. Their formation is a tightly regulated, transient response. In consequence the induction of immunoproteasome formation is an efficient instrument for a rapid adjustment to varying immunological challenges like an infection. The lower stability of immunoproteasomes

permits an expeditious return to the standard expression of constitutive 20S proteasomes once the immune response has been effective.

Keywords: proteasome, immunoproteasome, POMP, LMP7, Interferon_gamma, assembly, processing, maturation, proteasome stability, half-life, MHC class I - antigens, immune response

1	EINLEITUNG.....	8
1.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	8
1.2	Die zentrale Bedeutung des UPS für die Generierung von MHC Klasse I – Antigenen	10
1.3	Das 20S-Proteasom.....	12
1.4	Das Immunoproteasom	14
1.5	Die Biogenese des 20S-Proteasoms.....	16
1.5.1	Expression proteasomaler Untereinheiten.....	16
1.5.2	Initiation der Proteasom-Assemblierung	16
1.5.3	Eukaryotische Assemblierungsintermediate	19
1.5.4	Prozessierung der Propeptide und Maturierung des 20S-Proteasoms	20
1.5.5	Besonderheiten der Immunoproteasom-Formation	22
1.5.6	Akzessorische Faktoren der eukaryotischen 20S-Biogenese.....	24
1.6	Das humane <i>PSMB8</i> (<i>LMP7</i>) Gen und seine Besonderheiten	27
1.7	Stabilität und Abbau von 20S-Proteasomen.....	30
1.8	Zielstellung dieser Arbeit	31
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	32
2.1	Geräte	32
2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	32
2.2.1	Chemikalien und Inhibitoren	32
2.2.2	Enzyme.....	33
2.2.3	Kits.....	33
2.2.4	Verbrauchsmaterialien.....	34
2.3	Oligonukleotide	34
2.4	Plasmide	38
2.4.1	T7-Expressionsvektoren (<i>IVTT</i> , bakterielle Expression).....	38
2.4.2	Hefe-Expressionsvektoren.....	38
2.4.3	<i>mammalia</i> Expressionsvektoren	40
2.5	DIG-markierte RNA-Sonden	40
2.6	Antikörper.....	40
2.6.1	Primärantikörper für Immunoblots	40
2.6.2	Sekundärantikörper für Immunoblots.....	40
2.6.3	Antikörper für Immunfluoreszenz (FACS).....	40
2.6.4	Antikörper für Northern Blots	40
2.7	Längenstandards ("Marker").....	42
2.8	Bakterienstämme, Kultur, Transformation und Kryokonservierung.....	42
2.8.1	Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien	42
2.8.2	Erzeugung kompetenter Bakterien und Transformation	42
2.9	Hefestämme, Kultur, Transformation und konservierung.....	43
2.9.1	Kultur und Kryokonservierung von <i>S. cerevisiae</i>	43
2.9.2	Erzeugung kompetenter Hefen und Transformation.....	44
2.10	Humane Zelllinien, Kultur, Transfektion und Kryokonservierung	45
2.10.1	Metabolische ³⁵ S-Markierung (Pulse-Chase).....	47
2.10.2	Transfektion humaner Zellen	47
2.10.3	Stabile Transfektion und Screening	48
2.11	Molekularbiologische Arbeiten.....	49
2.11.1	Isolation von RNA und DNA aus humanen Zellen	49
2.11.2	Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden	49
2.11.3	Northern Blot	49
2.11.4	cDNA-Herstellung (Reverse Transkription).....	51
2.11.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
2.11.6	Analyse und Klonierung von DNA	52
2.11.7	Plasmidisolation aus <i>E. coli</i>	54
2.12	Proteinbiochemische Methoden	55
2.12.1	Proteinexpression.....	55
2.12.2	Proteinisolation bzw. -präparation.....	56
2.12.3	Analyse von Proteinen.....	61
2.13	Funktionelle Assays.....	64
2.13.1	Proteaseassay mit fluorogenen Peptidsubstraten	64

2.13.2	Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen	65
2.13.3	Protein-Protein-Interaktionen	65
2.13.4	FACS-Analysen	67
3	ERGEBNISSE	69
3.1	Initiation der eukaryotischen 20S-Proteasom-Assemblierung	69
3.1.1	<i>in vivo</i> - Protein-Protein-Interaktionen zwischen einzelnen humanen 20S-Untereinheiten	69
3.1.2	<i>in vitro</i> -Nachweis der Interaktion zwischen POMP und humanen β 5-Homologen	73
3.1.3	Indizien für frühe humane 20S-Assemblierungsintermediate in Dichtegradienten	74
3.1.4	Frühe humane 20S-Assemblierungsintermediate	77
3.2	Späte Ereignisse der eukaryotischen 20S-Proteasom-Assemblierung und Maturierung	79
3.2.1	Der humane Proteasom-Maturierungsfaktor POMP	79
3.2.2	Die POMP-Stabilität ist ein Marker für die Kinetik der Maturierung humaner 20S-Proteasomen	81
3.2.3	LMP7 determiniert anhand der Maturierungskinetik von Immuno-Precursorkomplexen die POMP-Stabilität	85
3.2.4	Die humanen LMP7-Transkriptvarianten E1 und E2	88
3.2.5	Partielle Kompensation der POMP-Stabilität in stimulierten Rko-Zellen durch LMP7_E2-Transfektion	89
3.2.6	Die Maturierungskinetik von Immunoproteasomen ist eine ausschließlich intrinsische Eigenschaft der Komplexe	91
3.2.7	Die humanen <i>PSMB8</i> -Allele LMP7_E2 _Q und LMP7_E2 _K	93
3.2.8	Wie wird die schnellere Immuno-Assemblierung gewährleistet?	96
3.3	Die Stabilität humaner 20S-Proteasomen	99
3.3.1	Der selektiv antiproliferative Effekt von IFN γ	99
3.3.2	Immunoproteasomen sind labiler als konstitutive 20S-Proteasomen	102
3.3.3	Die Stabilität des konstitutiven 20S-Proteasoms ist unabhängig von der Immunoproteasom-Biogenese	103
4	DISKUSSION	105
4.1	Initiation der 20S-Proteasom-Assemblierung	105
4.1.1	Interaction Trap	105
4.1.2	Putative frühe proteasomale Assemblierungsintermediate	107
4.2	Die Maturierung humaner 20S-Proteasomen	111
4.2.1	Immunoproteasomen reifen schneller als konstitutive Proteasomen	111
4.2.2	Wie wird die schnellere Immunoproteasom-Formation reguliert?	114
4.2.3	<i>in vivo</i> werden bevorzugt homogene Immunoproteasomen generiert – LMP7-Transkriptvarianten und -Allele	116
4.3	Die Defizienz an proteasomalen Immuno-untereinheiten und Pathogenese	119
4.4	Die Stabilität verschiedener 20S-Proteasomen und die proteasomale Homöostase	121
4.5	Mögliche funktionelle Konsequenzen der transienten Immunoproteasom-Anwort	123
	LITERATURVERZEICHNIS	124
	ANHANG	133
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	133
	LEBENS LAUF	135
	PUBLIKATIONEN	136
	DANKSAGUNG	137
	ERKLÄRUNG	138

1 EINLEITUNG

1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Der Proteinabbau in eukaryotischen Zellen wird durch zwei vorherrschende Systeme realisiert, dem vakuolären System über Phagosomen, Endosomen bzw. Lysosomen sowie dem ATP-abhängigen und Ubiquitin-vermittelten System. Die zentrale proteolytische Komponente des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) ist das sog. 26S-Proteasom, das mittels Poly-Ubiquitin markierte Substratproteine degradiert. Das 26S-Proteasom ist ein hochkonservierter 2.5MDa-Proteinasekomplex mit mindestens drei verschiedenen Endopeptidase-Aktivitäten [Reviews: (Coux, et al., 1996; Hershko and Ciechanover, 1998)]. Bis zu 90% aller zellulären Proteine werden proteasomal hydrolysiert, wobei neben kurzlebigen Proteinen mit regulatorischer Funktion hauptsächlich fehlerhafte bzw. fehlgefaltete Proteine in Form sog. DRIPs (*defective ribosomal products*) proteasomale Substrate darstellen (Finley, et al., 1987; Schubert, et al., 2000). Eine Vielzahl von regulatorischen Signalproteinen, die in zelluläre Regulationsmechanismen wie Expressionskontrolle, Zellzyklusregulation, Apoptosekontrolle, Entwicklung und Differenzierung, Stressantwort und Reaktion auf extrazelluläre Signale etc. involviert sind, wurden als proteasomale Substrate beschrieben. Nicht alle Proteine werden allerdings proteasomal zu Peptiden degradiert, z.T. werden Proteine durch das Proteasom spezifisch durch eine präzisen, endoproteolytischen Schnitt prozessiert, wie z.B. die p50-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF κ B (Palombella, et al., 1994). Proteasomen kommen ubiquitär vor und können bis zu 1% der löslichen Zellproteine ausmachen (Tanaka, et al., 1986). Sie sind im Nucleus und Cytoplasma lokalisiert bzw. liegen mit Endoplasmatischem Retikulum oder Cytoskelett assoziiert vor (Machiels, et al., 1995; Scherrer and Bey, 1994).

Zu degradierende Substrate werden für den Abbau markiert, indem eine enzymatische Kaskade multiple Ubiquitin-Moleküle kovalent an das Substrat heftet [Review: (Jesenberger and Jentsch, 2002)]. Ubiquitin ist ein kleines Polypeptid von 76AS, das eines der evolutionär am stärksten konservierten Proteine darstellt. Die sogenannte Ubiquitin-Enzym-Thioester-Kaskade umfasst zunächst die ATP-abhängige Aktivierung von Ubiquitin durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1). Aktiviertes Ubiquitin geht im folgenden eine intermediäre Thioesterbindung mit einem der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (E2) ein. In Abhängigkeit vom Charakter der zahlreichen Ubiquitin-Protein-Isopeptid-Ligasen (E3) wird das aktivierte Ubiquitin entweder über eine Thioesterbindung auf E3 transferiert oder die für die Substratspezifität verantwortliche E3-Ligase schafft nur eine räumliche Nähe zwischen Ub~E2 und Substrat. Letztlich wird eine kovalente Isopeptidbindung zwischen der ϵ -Aminogruppe eines internen Lysins des Substratproteins und dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins geknüpft. In mehreren Durchläufen dieser Kaskade werden multiple Ubiquitin-Einheiten wiederum über Isopeptidbindungen aneinander geheftet. Diese Poly-Ubiquitinierung bedarf in einigen Fällen der Assistenz eines E4 Multi-Ubiquitin-Konjugationsfaktors, syn. Ubiquitin-Ketten-Assemblierungsfaktor (Jesenberger and Jentsch, 2002).

Die Poly-Ubiquitinierung fungiert als Signal zur Erkennung und Degradation des Substrates durch das 26S-Proteasom [Review: (Glickman and Ciechanover, 2002)]. Dafür sind die sog. 19S-Regulatorkomplexe (syn. Proteasom-Aktivator PA700) des 26S-Proteasoms von Bedeutung (s. Abbildung 1).

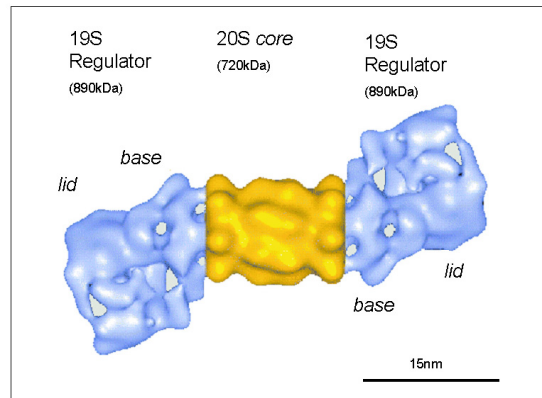


Abbildung 1: Die Struktur des 26S-Proteasoms. Zusammengesetztes Modell eines 26S-Proteasoms von *Drosophila*, basierend auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen und der Kristallstruktur des 20S Proteasoms von *Thermoplasma* [Abbildung nach: (Voges, et al., 1999)].

Je ein 19S-Regulatorkomplex bindet an beide Seiten der eigentlich proteolytisch aktiven Kerneinheit des 26S-Proteasoms, das 20S-Proteasom (s. Kapitel 1.3). Die 19S-Kappen (ca. 890kDa) erkennen, binden, entfalten und ermöglichen die ATP-abhängige Translokation des Substrates in die proteolytische Kammer, wobei Ubiquitin recycelt wird. Sie bestehen aus mindestens 17 Untereinheiten. Darunter finden sich sechs Untereinheiten mit ATPase-Aktivität und solche ohne, wie die Multiubiquitin-bindende Untereinheit. Regulatorkomplexe sind im Gegensatz zum 20S-Proteasom relativ labile Strukturen, die sich unter subphysiologischen ATP- bzw. Salz-Konzentrationen sowohl vom 20S-Komplex ablösen, als auch in zwei Subkomplexe zerfallen können, den sog. *Base*- bzw. *Lid*-Subkomplexen (Glickman, et al., 1998). In Abhängigkeit von z.B. extrazellulären Signalen können jedoch auch andere Subkomplexe reversibel an das 20S-Proteasom binden. Als weitere Modulatoren wurden z.B. der Proteasom-Inhibitor/Modulator PI-31 beschrieben (Zaiss, et al., 1999; Zaiss, et al., 2002) sowie der cytokin-induzierbare 11S-Regulatorkomplex bestehend aus Hetero-Heptamerringen der Proteasomaktivatoren PA28 α und β (Dubiel, et al., 1992; Ma, et al., 1992; Stohwasser, et al., 2000).

1.2 Die zentrale Bedeutung des UPS für die Generierung von MHC Klasse I – Antigenen

MHC-Proteine (*major histocompatibility complex*) sind wichtige Bestandteile der adaptiven Immunabwehr aufgrund ihrer Fähigkeit, Peptide auf der Oberfläche der Zelle zu präsentieren, die aus endogenen oder exogenen Proteinen stammen. An sog. MHC Klasse I - Moleküle von allen kernhaltigen Zellen werden vornehmlich Epitope von cytoplasmatischen Proteinen gebunden. MHC Klasse II - Moleküle werden von professionell Antigen-präsentierenden Immunzellen (APCs, *antigen presenting cells*) wie Makrophagen, B-Lymphozyten oder dendritischen Zellen exprimiert. Sie präsentieren hauptsächlich Epitope von extrazellulären Erregern, die über Endo- bzw. Phagozytose internalisiert, im Lysosomen-Phagosomen-System inaktiviert und deren Proteine durch verschiedene luminal Proteasen prozessiert wurden. Über spezifische Wechselwirkungen dieser Antigen-MHC-Komplexe mit Corezeptoren des T-Zell-Rezeptors (TCR) werden T-Lymphozyten aktiviert. T-Lymphozyten vermitteln maßgeblich die adaptive, zelluläre Immunität und werden in zwei funktionell verschiedene Klassen unterteilt, die sich in der Expression verschiedener Oberflächenmarker (CD, *cluster of differentiation*) unterscheiden. Der TCR-Komplex von CD4⁺ T-Helferzellen (T_H) interagiert mit MHC II - präsentierten Antigenen auf der Oberfläche von APCs. Die dadurch aktivierten T-Helferzellen unterstützen durch die Sezernierung immunmodulatorischer Botenstoffe (Cytokine) andere Zellen des adaptiven Immunsystems in der Abwehr der Infektion. Die Subklasse der inflammatorischen T_H1-Zellen aktiviert mittels Interleukin-2 (IL) und Interferon- γ (IFN) Makrophagen und andere T-Zellen (CTLs, s.u.). T_H2-Helferzellen regen B-Lymphozyten zur Differenzierung bzw. Antikörperproduktion an und befördern somit die humorale Immunantwort (Janeway, et al., 2001).

MHC I - Moleküle werden vornehmlich mit Peptiden beladen, die im Cytosol generiert werden. Selten werden im Rahmen einer *Cross presentation* auch Peptide, die im vesikulären System generiert wurden, durch MHC I präsentiert (Heath, et al., 2004). MHC I - Antigene stammen meist aus endogenen Proteinen, die entweder in der Zelle auf normaler Expression beruhend oder aufgrund der malignen Transformation einer Tumorzelle in nicht physiologischem Ausmaß synthetisiert werden. Auch Proteine von cytosolischen Erregern wie Viren oder intrazelluläre Mikroorganismen (z.B. *Listeria monocytogenes*) werden zu MHC I - Peptiden prozessiert. Die cytoplasmatische Generierung von antigenen Peptiden erfolgt hauptsächlich durch das UPS im Zusammenspiel mit möglicherweise weiteren *downstream* Proteasen (s.u.). Damit ist das Proteasom ein wesentlicher Bestandteil der zellulären Immunabwehr (Kloetzel, 2004).

Für die Bindung eines Peptids an ein MHC I – Molekül sind bestimmte strukturelle Voraussetzungen zu erfüllen. Ein MHC I - Ligand ist 8-10 Aminosäuren lang (Rammensee, 1995). Neben der basalen Interaktion des Peptids über Wasserstoffbrückenbindungen mit der MHC I - Bindungstasche wird eine solide Bindung und damit ein stabiler, präsentierbarer

Komplex nur dann ausgebildet, wenn das Peptid spezifische Ankerreste besitzt. Diese Ankerreste erlauben eine Bindung an die hochvariablen Bereiche der Bindungsfurche einer spezifischen MHC I - Variante, die somit jeweils nur ein bestimmtes Peptid-Repertoire zu binden vermag. Meist wird dafür ein hydrophober oder basischer C-Terminus benötigt, weitere interne primäre und sekundäre Ankerreste, die die Bindung erst ermöglichen bzw. unterstützen, sind für verschiedene MHC I - Varianten als sogenannte Sequenzmotive des Liganden beschrieben (Rock, et al., 2002; York, et al., 1999).

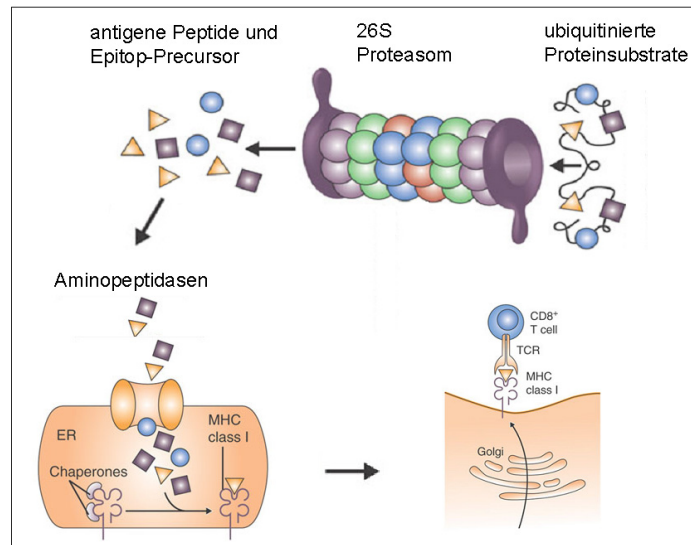


Abbildung 2: Prozessierung MHC I - restringierter Antigene. MHC I - Epitop-haltige Proteinsubstrate werden durch Polyubiquitinierung für die Degradation durch das 26S-Proteasom markiert. Die proteasomal generierten antigenen Peptide und Epitop-Precursor mit N-terminalen Verlängerungen werden durch cytosolische Aminopeptidasen weiter prozessiert, bevor sie durch TAP in das ER-Lumen transportiert werden. Nach möglicher weiterer Prozessierung durch ER-ständige Aminopeptidasen binden und stabilisieren die antigenen Peptide geeignete MHC I - Moleküle unter der Assistenz verschiedener Chaperone. Über den Golgi-Apparat werden Peptid-MHC I - Komplexe an die Zelloberfläche transportiert. Erfolgt dort eine spezifische Bindung zwischen dem T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR) eines CD8⁺ cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und dem komplementären MHC I - Antigen-Komplex, wird der CTL aktiviert [Abbildung nach (Kloetzel, 2004)].

Die Peptide werden zur Bindung an die ER-ständigen MHC I - Moleküle über spezifische Transporter (TAP, *transporter associated with antigen processing*) ins Lumen des ER transportiert. Die TAP-Komplexe sind Heterodimere aus TAP1 und TAP2 und gehören der Familie der ATP-abhängigen Membrantransporter an. Assemblierte Antigen-MHC I - Komplexe werden über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transferiert. Erfolgt dort eine Interaktion zwischen einem Antigen-MHC I - Komplex und dem TCR eines spezifischen CD8⁺ cytotoxischen T-Lymphozyts (CTL, *cytotoxic T lymphocyte*), wird dieser aktiviert. CTLs sezernieren daraufhin cytotoxische Faktoren wie Perforine und Granzym-Proteasen, wodurch die infizierte bzw. maligne entartete Zelle eliminiert und somit das Pathogen bzw. der Tumor beseitigt wird. Die unterschiedlichen Mechanismen der MHC I - bzw. MHC II -

vermittelten T-Zell-Aktivierung ermöglichen so eine adäquate Immunreaktion im Rahmen der adaptiven Immunabwehr gegen verschiedene pathologische Herausforderungen.

In jüngster Zeit wurden Studien veröffentlicht, die für die zentrale proteolytische Komponente zur Generierung von MHC I - Peptiden, das 26S-Proteasom, funktionelle Wechselwirkungen mit anderen Proteasen postulierten (s. Abbildung 2). So wird zunehmend davon ausgegangen, dass das 26S-Proteasom nicht die 'endgültigen', von MHC I - präsentierten Peptide von 8-10 Aminosäuren Länge entläßt, sondern auch Vorläuferpeptide. Diese besitzen zwar den korrekten C-Terminus für eine stabile Bindung des Peptids an das MHC I - Molekül, sind aber N-terminal um einige Aminosäuren elongiert. Die Prozessierung des Epitop-Precursorpeptids (*Trimming*) wird über eine Kaskade von Peptidasen des Cytosols (Leucinaminopeptidase, Thimet-Oligopeptidase, TPPII etc.), möglicherweise freien bzw. PA28-komplexierten 20S-Proteasomen und (nach dem TAP-vermittelten Transport) von ER-luminalen Aminopeptidasen (ERAP1, L-RAP) übernommen (Kloetzel, 2004; Rock, et al., 2004). Dieser Regulationskreis wird funktionell von extrazellulären Signalen wie Cytokinen im Rahmen einer Infektion beeinflusst. Somit ist die Prozessierung von MHC I - Epitopen wahrscheinlich von multiplen Faktoren der postulierten „Dualen Proteasom“-Kaskade abhängig und stellt einen variablen, dynamischen Prozess dar, der die Quantität und Qualität von generierten MHC I - Liganden steuert.

1.3 Das 20S-Proteasom

Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, sind die proteolytisch aktiven Zentren des 26S-Proteasom-Komplexes in dessen 700kDa-Kerneinheit, dem 20S-Proteasom (EC: 3.4.25.1) lokalisiert. Dieser Multiproteinkomplex ist ca. 15nm lang und umfasst einen Durchmesser von ca. 11nm. Kristallographische Untersuchungen zeigten, dass 20S-Proteasomen von Archae- und Eubakterien sowie von Eukaryoten sehr ähnliche Strukturen aufweisen (Lupas, et al., 1995). Sie sind aus vier Heptamerringen ($7\alpha 7\beta 7\beta 7\alpha$) aufgebaut (s. Abbildung 3), wobei die äußeren α -Ringe den Zugang zu dem zylindrischen Komplex kontrollieren und die inneren β -Ringe die katalytischen Zentren beherbergen. Dabei formen die inneren β -Ringe die zentrale Kammer, zwischen den α - und β -Ringern wird je eine Vorkammer ausgebildet. Diese inneren Kammern sind durch enge Kanäle mit einem Durchmesser von nur wenigen nm miteinander verbunden (Groll, et al., 1997; Lupas, et al., 1995). Elektronenmikroskopische Studien zu archaebakteriellen 20S-Proteasomen, wie die von *Thermoplasma acidophilum*, zeigten die Ringstruktur mit C2-Symmetrie zuerst auf. Das *Thermoplasma*-Proteasom ist aus 14 identischen β -Untereinheiten von je 22.3 kDa und 14 identischen α -Untereinheiten von 25.8 kDa aufgebaut (Dahlmann, et al., 1992; Lowe, et al., 1995; Puhler, et al., 1992). Der Modellkomplex eubakterieller 20S-Proteasomen von *Rhodococcus erythropolis* ist dahingehend komplexer, dass die gleiche $7\alpha 7\beta 7\beta 7\alpha$ -Struktur aus je zwei verschiedenen,

aber jeweils eng miteinander verwandten α - bzw. β - Untereinheiten aufgebaut ist (Tamura, et al., 1995; Voges, et al., 1999).

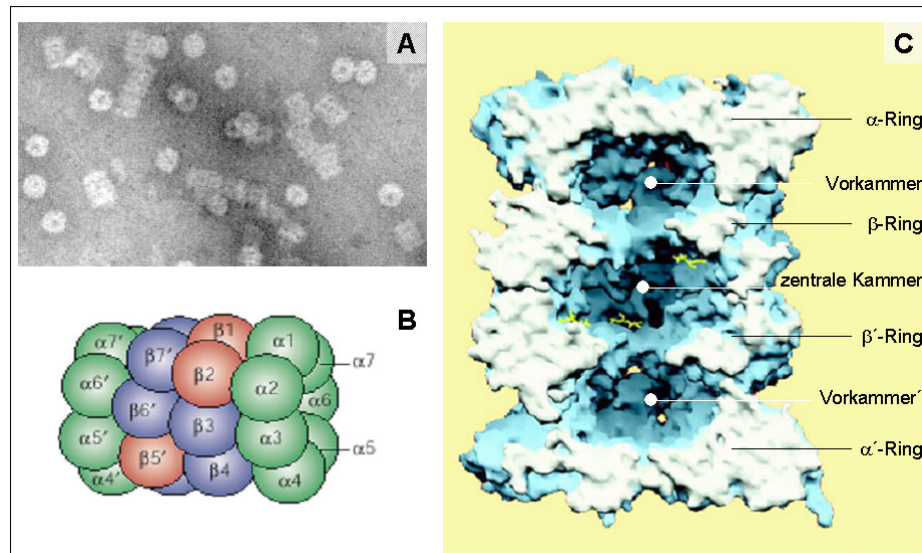


Abbildung 3: Das 20S-Proteasom. **A:** Elektronenmikroskopische Aufnahme (*negative stain*) von 20S-Proteasomen des Archaeons *Haloferax volcanii* [Abbildung aus: (Wilson, et al., 1999)]. **B:** Schematischer Aufbau des 20S-Partikels, wobei α -Untereinheiten grün, inaktive β -Untereinheiten blau und die aktiven β -Untereinheiten rot symbolisiert sind [Abbildung aus: (Kloetzel, 2001)]. **C:** Querschnitt durch das Oberflächenmodell von *S. cerevisiae* 20S-Proteasomen [Abbildung nach: (Bochtler, et al., 1999)]. Die Schnittflächen sind weiss eingefärbt und die aktiven β -Untereinheiten durch ihre Komplexierung mit dem Calpain-Inhibitor I (gelb) indiziert. Die Zuordnung der Heptamerringe und der Kammern des 20S-Komplexes sind angegeben.

Im Verlauf der Evolution der Proteasomen entstanden durch Genduplikationen immer mehr spezialisierte α - bzw. β -Untereinheiten, die räumliche Struktur blieb jedoch identisch (Hughes, 1997). So sind alle eukaryotischen 20S-Proteasomen wesentlich komplexer aus je sieben verschiedenen α -Untereinheiten und mindestens sieben verschiedenen β -Untereinheiten aufgebaut, die jeweils zweifach im Komplex vorhanden sind und in ihrer Größe zwischen ca. 21 und 30kDa rangieren. Die 28 Untereinheiten sind in ihrer räumlichen Anordnung im 20S-Komplex streng festgelegt: $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta'_{1-7}\alpha'_{1-7}$ (Groll, et al., 1997; Grziwa, et al., 1991; Perkins, et al., 1994; Unno, et al., 2002). Die äußeren α -Ringe eukaryotischer 20S-Proteasomen kontrollieren den Zugang in den Partikel (*gating*) und vermitteln die Interaktion mit anderen proteasomalen Subkomplexen wie den 19S-Kappen oder den Proteasom-Aktivator-Komplex [s. Kapitel 1.1, (Groll, et al., 2000; Groll, et al., 1997)].

Wie Experimente zur Hydrolyse von fluorogenen Peptidsubstraten zeigten, werden pro β -Ring die proteolytischen Aktivitäten von drei Untereinheiten vermittelt, weswegen das Proteasom auch als multikatalytische Protease bezeichnet wird (Wilk and Orłowski, 1983). $\beta 1$ (δ , PSMB6) besitzt PGPH-Aktivität (*peptidyl-glutamyl peptide hydrolysing activity*, syn. Caspase-ähnliche

Aktivität), die eine Hydrolyse von Peptidbindungen bevorzugt nach sauren Resten vermittelt. $\beta 2$ (Z, PSMB7) ist durch trypsin-ähnliche Aktivität charakterisiert und katalysiert die Hydrolyse bevorzugt C-terminal von basischen Resten. Die chymotryptische Peptidase-Aktivität (Hydrolyse nach hydrophoben oder aromatischen Resten) vermittelt $\beta 5$ [MB1, PSMB5, (Dahlmann, et al., 1986; Orłowski, et al., 1993; Wilk and Orłowski, 1983)]. Inwieweit zwei weitere, weniger genau charakterisierte Aktivitäten, die die Hydrolyse nach verzweigten (BrAAP: *branched-amino-acid peptidase*) bzw. neutralen Resten (SNAAP: *small neutral amino-acid peptidase*) katalysieren, u.U. auch von anderen β -Untereinheiten wie $\beta 7$ vermittelt werden könnten, ist umstritten (Cardozo, et al., 1992; Dick, et al., 1998; Orłowski, et al., 1993; Unno, et al., 2002). Die Zuordnung der drei zentralen Spaltpräferenzen erfolgte anhand von Untersuchungen mit Peptidsubstraten. Die aktiven Zentren sind darauf jedoch nicht absolut festgelegt, die Spaltmuster in längeren Substraten hängen u.a. auch von der umgebenden Sequenz ab, so dass Proteasomen Peptidbindungen nach nahezu jeder beliebigen Aminosäure eines Proteins spalten können (Kloetzel, 2001; Nussbaum, et al., 1998).

Die proteolytisch aktiven β -Untereinheiten von Proteasomen gehören der Enzymfamilie der Ntn-Hydrolasen (*N-terminal nucleophile*) an (Groll, et al., 1997; Seemüller, et al., 1995; Seemüller, et al., 1995). Deren aktives Zentrum ist ein N-terminaler Threoninrest (Thr-1). In der räumlichen Struktur befinden sich verschiedene konservierte Reste (z.B. Lys33) in der Umgebung der aktiven Zentren. Deren essentielle Bedeutung liegt in der Bereitstellung eines Protonen-Akzeptors bzw. in der Ausbildung eines komplexen Systems zur Polarisierung von Substrat und Enzym, das den nucleophilen Charakter des aktiven Zentrums verstärkt (Arendt and Hochstrasser, 1999; Groll, et al., 2003; Groll, et al., 1997; Orłowski and Wilk, 2000).

1.4 Das Immunoproteasom

In Vertebraten wurde durch zusätzliche Genduplikationen von β -Untereinheiten eine weiter gesteigerte Komplexität erzielt. Durch immunmodulatorische Cytokine wie IFN γ oder Tumornekrose-Faktor α (TNF) kann die Expression von drei weiteren, proteolytisch aktiven β -Untereinheiten induziert werden, welche homolog zu den drei aktiven konstitutiven Untereinheiten $\beta 1$ (δ), $\beta 2$ (Z) und $\beta 5$ (MB1) sind [Reviews: (Kloetzel, 2004; Rock and Goldberg, 1999)]. Deswegen werden die fakultativen Untereinheiten $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$ Immununtereinheiten genannt (Aki, et al., 1994). Synonym werden sie auch als LMP2 (*low molecular weight protein 2*), MECL-1 (*multicatalytic endopeptidase complex-like 1*) und LMP7 (*low molecular weight protein 7*) bezeichnet (Brown, et al., 1991; Glynn, et al., 1991; Groettrup, et al., 1996; Hisamatsu, et al., 1996; Martinez and Monaco, 1991; Nandi, et al., 1996; Ortiz-Navarrete, et al., 1991). Immununtereinheiten können nicht in prä-existente konstitutive 20S-Proteasomen eingefügt werden (Griffin, et al., 1998; Groettrup, et al., 1997; Nandi, et al., 1997). Die Formation von Immunoproteasomen verläuft ausschließlich über eine

de novo Synthese aller Untereinheiten und deren Assemblierung (s. Kapitel 1.5.5). Proteasomen, die aktive Immununtereinheiten enthalten, werden Immunoproteasomen genannt, um die funktionelle Korrelation mit dem Immunsystem zu unterstreichen. In Zellen des Immunsystems und lymphoiden Organen, wie Thymus, Milz und Lymphknoten, sind Immunoproteasomen auch ohne eine Cytokinstimulation der vorherrschende Proteasomtyp, da in diesen Zellen Immununtereinheiten 'konstitutiv', im Sinne von permanent, exprimiert werden (Eleuteri, et al., 1997; Macagno, et al., 1999; Noda, et al., 2000; Stohwasser, et al., 1997). In fast allen anderen Zellen werden sie basal eher gering exprimiert und erst durch Cytokine induziert (Khan, et al., 2001).

Immunoproteasomen sind zwar nicht essentiell für die MHC I - Antigenpräsentation, aber für die Generierung bestimmter CTL-Epitope von großer Bedeutung [Reviews: (Groettrup, et al., 2001; Kloetzel, 2001; Kloetzel, 2004; Kruger, et al., 2003)]. Im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen besitzen Immunoproteasomen wahrscheinlich keine grundlegend veränderte proteolytische Aktivität, allerdings wurden sowohl unterschiedliche Kinetiken der Peptidgenerierung als auch eine effizientere Nutzung spezifischer Spaltstellen durch Immunoproteasomen beschrieben. Zahlreiche Studien erzielten bezüglich der Spaltpräferenzen von konstitutiven und Immunoproteasomen z.T. widersprüchliche Ergebnisse. Meist wurde für Immunoproteasomen eine verringerte Caspase-ähnliche Aktivität gegenüber Peptidsubstraten aufgrund der Substitution von $\beta 1$ (δ) durch $\beta 1i$ (LMP2) beschrieben (Boes, et al., 1994; Driscoll, et al., 1993; Eleuteri, et al., 1997; Kuckelkorn, et al., 1995; Ustrell, et al., 1995). Diese veränderte Substratspezifität soll die Generierung von Peptiden mit einer erhöhten Bindungskapazität an MHC-Klasse I- Moleküle optimieren. Für die anderen Immununtereinheiten konnte keine eindeutige Veränderung der proteolytischen Aktivität beschrieben werden, zumal im Polypeptid-Kontext eine solche Zuordnung nicht eindeutig zu treffen ist (s.o.). Die Substitution der aktiven Untereinheiten hat somit keinen generalisierbaren Effekt auf die Nutzung bestimmter Spaltstellen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass nur Immunoproteasomen z.B. ein spezifisches Hepatitis B Virus *core* Antigen (HBcAg) effizient generieren können (Sijts, et al., 2000). Dafür ist die Untereinheit $\beta 5i$ (LMP7) als strukturelle Komponente des Immunoproteasoms essentiell. Die katalytische Aktivität von LMP7 ist hingegen entbehrlich, wie Experimente mit der proteolytisch inaktiven LMP7_T1A-Mutante zeigten. Somit wird davon ausgegangen, dass die Inkorporation der Immununtereinheiten strukturelle Veränderungen durch Konformationsänderungen hervorruft, die sich wiederum auf die präferentielle Nutzung spezifischer Spaltstellen eines Substrates auswirken (Dahlmann, et al., 2000; Sijts, et al., 2000). Dadurch kann ein bestimmtes antigenes Peptid durch Immunoproteasomen relativ häufiger generiert werden. Daraus resultieren ein verändertes Repertoire an bindungs-optimierten MHC I -Liganden, ein verändertes Spektrum an präsentierten immundominanten Epitopen und letztlich eine verbesserte CTL-abhängige Immunantwort (Cascio, et al., 2001; Kloetzel, 2004; Schwarz, et al., 2000; Sijts, et al., 2000; Sijts, et al., 2000; Toes, et al., 2001).

1.5 Die Biogenese des 20S-Proteasoms

1.5.1 Expression proteasomaler Untereinheiten

Zur Regulation der Expression proteasomaler Untereinheiten ist bisher relativ wenig bekannt. In *S. cerevisiae* wurde RPN4 als transkriptioneller Aktivator der basalen Expression der proteasomalen Untereinheiten beschrieben (Mannhaupt, et al., 1999; Xie and Varshavsky, 2001). Der Transkriptionsfaktor bindet an eine nonamere 5' regulatorische Sequenz PACE (*proteasome associated controll element*), die alle proteasomalen Gene der Hefe kennzeichnet. Da das RPN4-Protein selbst wiederum proteasomales Substrat ist, wird über einen negativen *feed-back loop* die weitere Proteasom-Expression inhibiert, sind genügend aktive Proteasomen in der Zelle vorhanden. Zusätzlich dazu erfolgt die Feinregulation der proteasomalen Homöostase in Hefezellen evtl. über die Registrierung der proteasomalen Aktivität (Fleming, et al., 2002) bzw. von freiem Ubiquitin oder poly-ubiquitinierten Substraten (London, et al., 2004).

In Vertebraten wurde bisher weder ein RPN4-Homolog, noch eine PACE-ähnliche Sequenz proteasomaler Gene beschrieben. Generell wurde bislang keine Konsensus-Sequenz für gemeinsamen Transkriptionsfaktoren in den 5'-Bereichen der *mammalia* Gene für konstitutive proteasomale Untereinheiten gefunden. Die Promotoren der humanen Gene für 20S-Untereinheiten sind bisher nur durch die Beschreibung verschiedener GC-Boxen charakterisiert. Sie besitzen (mit der Ausnahme von *PSMA3* [$\alpha 7$]) wahrscheinlich keine TATA-Boxen oder CAAT-Elemente (Akioka, et al., 1995; Coux, et al., 1996; Tamura, et al., 1994). Nur die Promotoren der Gene, die für die IFN γ -induzierbaren Immununtereinheiten codieren, sind eingehender untersucht wurden (vgl. Kapitel 1.6). Trotzdem indizieren zahlreiche Untersuchungen eine Regulation der Expression aller Proteasom-Untereinheiten ebenfalls in Zellen höherer Organismen unter verschiedenen Bedingungen (Du, et al., 2000; Kuckelkorn, et al., 2000; Price, et al., 1996). So resultierte die durch RNAi (*double stranded RNA interference*) reduzierte Expression einzelner 20S-Untereinheiten in *Drosophila* in einer vermehrten mRNA- und Proteinexpression anderer, nicht inhibierter 20S-Untereinheiten (Wojcik and DeMartino, 2002). Auch die Inhibition der Proteasom-Aktivität *per se* durch Proteasominhibitoren, wie Lactacystin oder MG132, induzierte dosis- und zeitabhängig eine transiente und konzertierte, bis zu dreifach gesteigerte mRNA- und Proteinexpression aller proteasomalen Untereinheiten in glatten Muskelzellen der Ratte (Meiners, et al., 2003). Diese Induktion basierte ausschließlich auf der Aktivierung der Transkription und führte zu einer vermehrten *de novo* Proteasom-Formation.

1.5.2 Initiation der Proteasom-Assemblierung

Die präzise Zusammenlagerung von 28 Untereinheiten zu einem 20S-Proteasom-Komplex ist ein koordinierter, mehrstufiger Prozess, der sicherstellt, dass die bis zu 14 verschiedenen Komponenten in der richtigen Reihenfolge und in der korrekten Position inkorporiert werden

[Reviews: (Gerards, et al., 1998; Heinemeyer, et al., 2004; Kruger, et al., 2001)]. Die Assemblierung von Proteasomen verläuft über sog. Vorläufer-Intermediate mit unterschiedlicher Zusammensetzung. β -Untereinheiten werden als sogenannte Proproteine, also inaktive Vorläuferproteine mit N-terminalen Propeptiden, synthetisiert. Inaktive Proteasom-Vorläuferkomplexe, die Proformen von β -Untereinheiten enthalten, werden als Precursorkomplexe bezeichnet. Die Prozessierung der inaktiven Proproteine, also das autokatalytische bzw. wechselseitige Entfernen der Propeptide, ist an späte Assemblierungsstadien gekoppelt. Dadurch werden die aktiven Zentren (Thr1) der (aktiven) β -Untereinheiten freigelegt und das Proteasom maturiert zu einem aktiven Komplex. In den folgenden Kapiteln wird die Proteasom-Assemblierung in verschiedenen Organismen näher beschrieben.

1.5.2.1 PROKARYOTISCHE MODELLE DER 20S-ASSEMBLIERUNG

Für prokaryotische Zellen wurden zwei verschiedene Wege der initialen Zusammenlagerung der α - und β -Untereinheiten postuliert. Das einfache 20S-Proteasom des Archaeons *Thermoplasma acidophilum* besteht aus nur je einer α - und β -Untereinheit in der bereits beschriebenen $7\alpha 7\beta 7\beta \alpha$ -Struktur (Zwickl, et al., 1992). Die heterologe Expression der α -Untereinheit von *Thermoplasma* (α_{Th}) in *E.coli* führte zu deren spontanen Zusammenlagerung zu $7\alpha_{Th}$ -Ringen, welche wiederum zu Doppelringen assoziierten (Zwickl, et al., 1994). Wurde die β_{Th} -Untereinheit als Proprotein allein in *E.coli* exprimiert, erfolgte keine Oligomerisierung. Nach einer heterologen Coexpression von α_{Th} und β_{Th} wurde eine Bindung der β_{Th} -Untereinheiten an die vorassemblierten $7\alpha_{Th}$ -Ringe beobachtet. Die dadurch ausgelöste Konformationsänderung erlaubte eine Dimerisierung dieser Doppelringstrukturen ($7\alpha_{Th} 7\beta_{Th}$) und eine Generierung eines funktionellen Proteasoms nach Abspaltung des kurzen β -Propeptids (Zwickl, et al., 1994; Zwickl, et al., 1992). Somit soll die Assemblierung von *Thermoplasma*-Proteasomen mit einer 7α -Ring-Matrix, die eine 'Andockstation' für die β -Proproteine darstellt, beginnen (s. Abbildung 4). Auch die *in vitro* Assemblierung anderer archaebakterieller Proteasomen wie von *Methanosarcina* oder *Methanococcus* erfolgte über α -Ring-Strukturen unabhängig von zusätzlichen Faktoren (Maupin-Furlow, et al., 1998; Wilson, et al., 2000). Ob allerdings auch deren *in vivo* Formation über eine 7α -Ring-Matrix verläuft, ist fraglich. Es konnte bisher kein freier 7α -Ring isoliert werden, selbst bei der gemeinsamen heterologen Expression der α - und β -Untereinheiten (Heinemeyer, et al., 2004).

Im Gegensatz zu diesem Modell verläuft die Biogenese des *Rhodococcus*-Proteasoms nicht über eine freie 7α -Ring-Matrix. Das Proteasom des eubakteriellen Actinomyceten *Rhodococcus erythropolis* besteht aus je zwei α - und β -Untereinheiten, die jeweils eng miteinander verwandt sind (Tamura, et al., 1995). Eine singuläre Expression der beiden α_{Rh} -Untereinheiten in *E.coli* resultierte nicht in Vorassemblierungsformen. Es waren analog zu den

allein exprimierten β_{Rh} -Proformen nur Monomere zu beobachten (Zuhl, et al., 1997). Jegliche Kombination der heterologen Coexpression von α_{Rh} - und β_{Rh} -Untereinheiten führte jedoch zur Assemblierung funktioneller Proteasomen (s. Abbildung 4). Deshalb gelten Heterodimere von α_{Rh} / β_{Rh} als erste Assemblierungsintermediate des *Rhodococcus*-Proteasoms, die anschließend über eine schrittweise Zusammenlagerung und die finale Prozessierung der sehr langen β -Propeptide maturieren (Lupas, et al., 1997; Zuhl, et al., 1997; Zuhl, et al., 1997).

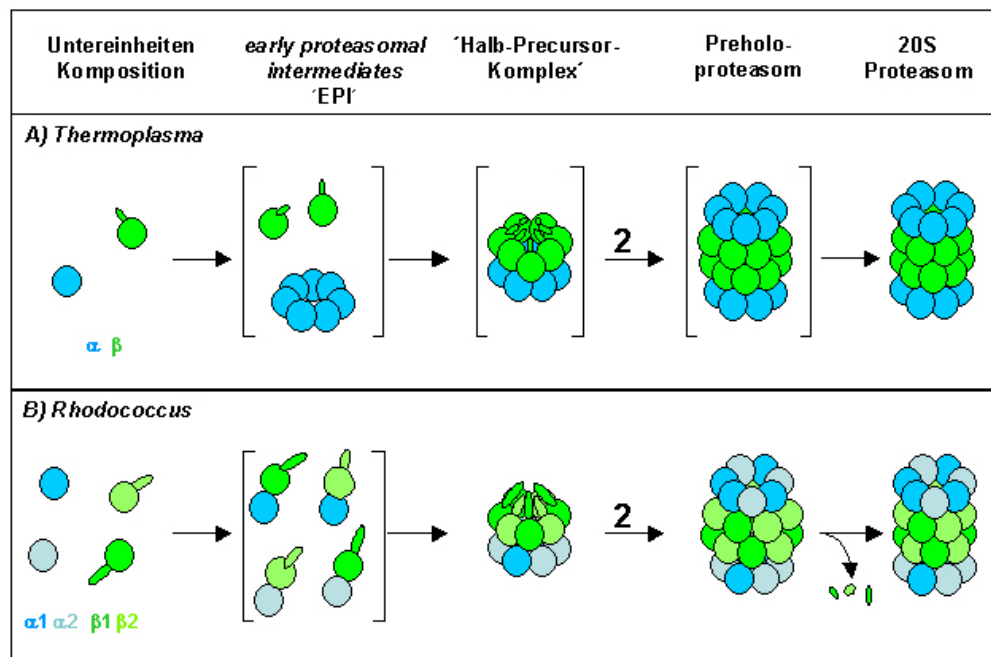


Abbildung 4: Modelle der prokaryotischen 20S-Proteasom-Biogenese. Fünf Stadien der 20S-Assemblierung in *Thermoplasma* (A, α -Ring-Matrix) bzw. *Rhodococcus* (B, α - β -Dimer-Modell) sind angegeben: freie Untereinheiten (α -Untereinheiten in blau, β -Untereinheiten in grün), frühe proteasomale Intermediate (EPIs), sogenannte 'Halb-Precursorkomplexe' (bestehend aus je einem Heptamerring von α - und pro β -Untereinheiten), die zu inaktiven Preholoproteasomen dimerisieren sowie reife 20S-Proteasomen. Komplexe in eckigen Klammern waren bisher aufgrund ihrer großen Instabilität nicht *in vivo* nachzuweisen [Abbildung nach (Heinemeyer, et al., 2004)].

1.5.2.2 INITIATION DER 20S-ASSEMBLIERUNG IN EUKARYOTEN

Zur initialen 20S-Assemblierung in Eukaryoten liegen bisher wenige Erkenntnisse vor. Nach bakterieller Expression konnten heptamere Strukturen der humanen $\alpha 7$ -Untereinheit nachgewiesen werden, die wiederum zu Doppel-Ring-Strukturen assoziierten (Gerards, et al., 1997). Im Gegensatz dazu formierten die humane $\alpha 6$ - bzw. $\alpha 1$ -Untereinheiten, jeweils singulär heterolog exprimiert, keinerlei ringähnliche Komplexe. Eine Coexpression aller drei α -Untereinheiten führte zur Ausbildung von heterooligomeren Ringkomplexen mit divergenter Zusammensetzung und hoher Varianz der Untereinheiten-Position (Gerards, et al., 1998; Gerards, et al., 1997). Auch die heterologe Expression der $\alpha 5$ - bzw. $\alpha 6$ -Untereinheit von *Trypanosoma brucei* führte zur Ringformation, allerdings erfolgte hier eine Assoziation zu

Komplexen, bestehend aus bis zu vier Heptamerringen (Huang, et al., 1999; Yao, et al., 1999). Aufgrund dieser Daten wurde vermutet, dass eine koordinierte Ringbildung zwischen den sieben α -Untereinheiten nicht allein durch deren Sequenz vermittelt wird, also keine selektive Zusammenlagerung einer α -Untereinheit mit ihrem Nachbar über eine definierte Interaktionsstelle erfolgt. Somit setzt sich immer mehr die These durch, dass die initiale eukaryotische Proteasom-Assemblierung nicht über einen vorassemblierten heptameren α -Ring verläuft [Reviews: (Gerards, et al., 1998; Heinemeyer, et al., 2004)]. Ähnlich dem *Rhodococcus*-Modell sollen auch in Eukaryoten spezifische α - β -Interaktionen in α/β -Heterodimerisierungen (z.B. $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 3$, $\alpha 4\beta 4$) resultieren, an die in geordneter Reihenfolge zunehmend mehr Untereinheiten anlagern. Andere Publikationen zur initialen eukaryotischen Proteasomformation befürworten hingegen das 7α -Matrix-Modell. Dabei wird den Untereinheiten $\alpha 4$ und $\alpha 7$ eine entscheidende Funktion während der 7α -Matrix-Initiation beigemessen (Apcher, et al., 2004). Eine strukturelle Analyse verschiedener 20S-Proteasomen führte zu der These, dass die Kontaktfläche zwischen den α -Untereinheiten die Fähigkeit zur Formation einer 7α -Matrix determiniert (Kwon, et al., 2004). *Mammalia* 20S-Proteasomen sind durch eine im Vergleich zum *Rhodococcus*-Proteasom große α - α -Kontaktregion gekennzeichnet. Deshalb schlussfolgern die Autoren, dass die eukaryotische Assemblierung möglicherweise doch über die Formation eines freien 7α -Ringes verlaufen könnte (Kwon, et al., 2004). Im Gegensatz sowohl zum 7α -Matrix-Modell als auch zum α/β -Dimer-Modell steht die These, daß evtl. die 'frühen' β -Untereinheiten (s. Kapitel 1.5.3) $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$ oligomerisieren, woran sich wiederum die α -Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$ einzeln oder vorassoziiert anlagern könnten (Nandi, et al., 1997).

1.5.3 Eukaryotische Assemblierungsintermediate

Die genauen Mechanismen der 20S-Assemblierung in Eukaryoten sind bisher unbekannt [Reviews: (Gerards, et al., 1998; Heinemeyer, et al., 2004; Kruger, et al., 2001; Schmidt, et al., 1997)]. Als frühestes Assemblierungsintermediat gilt ein muriner Komplex, bestehend aus einem kompletten heptameren α -Ring und den Proformen der 'frühen' β -Untereinheiten $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$ (Nandi, et al., 1997). Bezüglich der Assemblierung von Hefe-Proteasomen wird eine Stabilisierung solcher früher Komplexe durch die Interaktion des C-Terminus' von $\beta 2$ mit der $\beta 3$ -Untereinheit diskutiert (Ramos, et al., 2004). Die sukzessive Anlagerung der weiteren β -Untereinheiten ($\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$ und $\beta 1$) führt zu einem ca. 300kDa-Assemblierungsintermediat mit einem Sedimentationskoeffizienten von ca. 13S. Diese 13S-Precursorkomplexe konnten *in vivo* in murinen bzw. humanen Zellen nachgewiesen werden (Frentzel, et al., 1994; Schmidt, et al., 1997; Schmidtke, et al., 1997). Da diese Komplexe aus jeweils einem heptameren Ring von α - sowie von unprozessierten β -Untereinheiten zusammengesetzt sind, werden sie auch Halb- bzw. Hemi-Precursorkomplexe genannt. Erst die vollständige Inkorporation aller β -

Proformen führt zur Ausbildung von potentiellen Interringkontakten zwischen den β -Untereinheiten, die eine Dimerisierung der Doppelring-Strukturen ermöglicht. Wie die Deletion des C-Terminus der 'späten' $\beta 7$ -Untereinheit in Hefe zeigte, sind diese Interringkontakte für die Komplexdimerisierung von großer Bedeutung (Ramos, et al., 2004). Komplexe, die aus vier Heptamerringen aufgebaut sind, werden Pre-Holoproteasomen genannt (Yang, et al., 1995). Ob Pre-Holoproteasomen und die sog. 16S-Assemblierungsintermediate von ca. 650kDa (Frentzel, et al., 1994; Schmidtke, et al., 1997) identische Komplexe darstellen, ist strittig. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die aus humanen Zellen isolierten 16S-Intermediate aus vier Ringen aufgebaut sind (Heinemeyer, et al., 2004; Schmidt, et al., 1997). Die Stabilisierung des 16S-Precursor-Komplexes erfordert u.U. cytosolische Chaperone der HSP 70-Familie, die nachweislich mit diesem Komplex assoziiert vorliegen (Schmidt, et al., 1997; Schmidtke, et al., 1997). Die Chaperone sollen die korrekte Faltung der Assemblierungsintermediate vermitteln, um zunächst die Dimerisierung und anschließend die Prozessierung der β -Proformen (s. Kapitel 1.5.4) zu gewährleisten.

Über die Kinetik der eukaryotischen Proteasom-Biogenese ist bisher nur wenig bekannt. Die initiale Komplexbildung soll recht schnell verlaufen. Als geschwindigkeitsbestimmende Schritte werden die Dimerisierung von Doppelring-Strukturen und die Maturierung zum reifen 20S-Komplex eingeschätzt (Gerards, et al., 1998). In der Literatur wurden verschiedene Werte für die Stabilität von eukaryotischen Proteasom-Precursorkomplexen angegeben. Hefeproteasomen maturieren innerhalb von 30 bis 40 Minuten (Chen and Hochstrasser, 1996; Ramos, et al., 1998). Yang *et al.* beschrieben aufgrund von *Pulse Chase*-Experimenten eine sehr geringe Stabilität von murinen Precursorkomplexen. Nach einer *chase*-Zeit von nur zwei Stunden waren alle markierten Precursorkomplexe vollständig zu aktiven Proteasomen mit prozessierten β -Untereinheiten maturiert (Yang, et al., 1995). Die Publikation von Thomson *et al.* beschreibt eine sehr schnelle Prozessierung der späten Untereinheit $\beta 7$ in humanen Zellen, die nach 30min vollständig abgeschlossen war (Thomson and Rivett, 1996). Für andere murine bzw. humane Zellen wurde mit einer Halbwertszeit von ca. fünf Stunden eine größere Stabilität von Precursorkomplexen beschrieben (Frentzel, et al., 1994; Griffin, et al., 1998; Nandi, et al., 1997). Somit scheint sowohl die Menge an Precursorkomplexen als auch deren Stabilität stark vom Charakter der untersuchten Zellen und deren Proliferation abhängig zu sein (Nandi, et al., 1997).

1.5.4 Prozessierung der Propeptide und Maturierung des 20S-Proteasoms

Alle Ntn-Hydrolasen werden als inaktive Proformen mit N-terminalen Prosequenzen exprimiert, die durch autokatalytische Prozessierung aktiviert werden (Heinemeyer, et al., 2004; Seemuller, et al., 1996). Mit Ausnahme von $\beta 3$ und $\beta 4$ werden auch alle proteasomalen β -Untereinheiten prozessiert (Schmidtke, et al., 1996). Erst durch die Prozessierung werden

die dann N-terminal endständigen aktiven Zentren (Thr₁) der katalytischen β -Untereinheiten freigelegt und maturierte 20S-Proteasomen generiert. Die effiziente Prozessierung bedarf umfangreicher struktureller Voraussetzungen, wie einer Konsensussequenz aus Gly₋₁, Thr₁, Thr₂, die allen aktiven proteasomalen β -Untereinheiten gemein ist (Chen and Hochstrasser, 1995; Schmidtke, et al., 1996; Seemuller, et al., 1996; Seemuller, et al., 1995). Die vollständige Prozessierung der β -Proteine erfolgt ausschließlich im naszierenden Proteasom (Frentzel, et al., 1994; Seemuller, et al., 1996) und wird erst in den späten Stadien der Proteasom-Assemblierung im Pre-Holoproteasom-Komplex eingeleitet (Chen and Hochstrasser, 1996; Schmidtke, et al., 1996; Schmidtke, et al., 1997). So erfordert z.B. die autokatalytische Aktivierung von β 5 eine vorherige Dimerisierung zweier Hemi-Precursorkomplexe und die daraus resultierende Angrenzung an β 4 und Pro- β 5 des benachbarten β -Rings im naszierenden Hefeproteasom (Chen and Hochstrasser, 1996).

Die Prozessierung umfasst sowohl inter- als auch intramolekulare Autokatalyse und verläuft in einem Zwei-Schritt-Mechanismus über Zwischenformen einzelner β -Proteine mit sequentiell verkürzten Propeptiden (Schmidtke et al., 1996). Dadurch existieren von einer β -Untereinheit bis zu drei Formen: Proprotein (p), Prozessierungsintermediat (pi) und maturierte Untereinheit (m). Wahrscheinlich vollzieht die β 2-Untereinheit, die sich als einzige Untereinheit vollständig selbst prozessiert, den jeweils ersten Schnitt zur Intermediärform. Die abschließende Entfernung des Propeptids erfolgt bei aktiven β -Untereinheiten mittels Autokatalyse (Chen and Hochstrasser, 1996; Schmidtke, et al., 1996). Auch die inaktiven Untereinheiten β 6 und β 7 werden im Verlauf der Maturierung des 20S-Proteasoms teilweise prozessiert (Schmidtke, et al., 1996). Dies wird im Komplex vom jeweils nächsten aktiven Nachbarn vermittelt (Groll, et al., 1997; Groll, et al., 1999), wobei dieser auch im benachbarten β -Heptamerring liegen kann (Salzmann, et al., 1999).

1.5.4.1 DIE ESSENTIELLE BEDEUTUNG DER β -PROPEPTIDE

Aufgrund verschiedener Untersuchungen wird die Bedeutung der Prosequenzen der proteasomalen β -Untereinheiten für die Assemblierung und Maturierung von 20S-Proteasomen kontrovers diskutiert. Plausibel ist, dass Propeptide die proteolytische Aktivität des naszierenden Proteasoms unterdrücken, bis gewährleistet ist, dass alle aktiven Zentren im Inneren des Komplexes lokalisiert liegen und nur 'erwünschte' Substrate degradiert werden. Weiterhin bewahren sie die aktiven Zentren (Thr₁) vor einer Inaktivierung aufgrund Acetylierung durch N α - Acetyltransferasen (Arendt and Hochstrasser, 1999; Jager, et al., 1999). Die Prosequenzen sollen aber auch als intramolekulare 'Chaperone' fungieren und die für eine Inkorporation der β -Proteine korrekte Faltung vermitteln (Chen and Hochstrasser, 1996). Weiterhin wird ihnen eine die Assemblierung unterstützende Funktion zugeschrieben, indem sie die Kontaktflächen zwischen der jeweiligen β - und den angrenzenden α -Untereinheiten vergrößern (Kwon, et al., 2004). Wahrscheinlich sind sie nicht, wie zunächst

angenommen, für die präzise Positionierung der einzelnen β -Proteine im naszierenden Komplex verantwortlich [s. Kapitel 1.5.5, (Schmidt, et al., 1999; Schmidtke, et al., 1996)].

Das mit acht Aminosäuren sehr kurze Propeptid der β -Untereinheit von *Thermoplasma* scheint von geringer Bedeutung für die *in vitro* Proteasom-Formation zu sein (Grziwa, et al., 1994). Eine Prosequenz-Deletion verlangsamt die Assemblierung bei heterologer Expression in *E. coli* nur sehr geringfügig und hat keinen Einfluss auf die Maximalaktivität des Proteasoms (Zwickl, et al., 1994). Eine wesentliche Funktion scheinen jedoch die langen Propeptide der *Rhodococcus* β -Untereinheiten zu haben, obwohl auch sie nicht essentiell für die Formation aktiver Proteasomen sind. Eine Deletion dieser Prosequenzen resultierte in einer deutlichen Verringerung der Effizienz der 20S-Assemblierung. Die separate Zugabe der Prosequenzen *in trans* konnte diesen Verlust jedoch kompensieren (Zuhl, et al., 1997).

Auch der Einfluss verschiedener Prosequenz-Deletionen von sowohl aktiven als auch inaktiven β -Untereinheiten der Hefe sind untersucht worden. Die Deletion des Propeptids der $\beta 5$ -Untereinheit ist lethal (Chen and Hochstrasser, 1996). Demgegenüber konnten zwar Hefestämme mit einer $\beta 2$ -Prosequenz-Deletion (Δ pro- $\beta 2$) generiert werden, diese waren jedoch temperatur-sensitiv und zeigten Defizite in der 20S-Assemblierung auf. Die Deletion der Propeptide von $\beta 1$ bzw. $\beta 7$ hatte keinen deutlichen Einfluß auf die Maturierung des 20S-Proteasoms in Hefe (Arendt and Hochstrasser, 1999; Jager, et al., 1999). Zusammenfassend wird den Prosequenzen der aktiven β -Untereinheiten in Hefe somit eine hierarchische Bedeutung beigemessen ($\beta 5 > \beta 2 > \beta 1$). Auch die Prosequenz der inaktiven $\beta 6$ -Untereinheit in Hefe ist teilweise essentiell, da der C-terminale 'Überrest' dieser partiell prozessierten Prosequenz zur intakten Struktur des reifen 20S-Proteasoms beiträgt (Heinemeyer, et al., 2004). Die Rolle der Prosequenzen bei der Formation von *mammalia* 20S-Proteasomen wurde vor allem anhand der Immununtereinheiten untersucht (s. Kapitel 1.5.5).

1.5.5 Besonderheiten der Immunproteasom-Formation

Immunmodulatorische Cytokine wie $\text{IFN}\gamma$ induzieren in Vertebraten die Synthese der fakultativen Immununtereinheiten LMP2 ($\beta 1i$), MECL-1 ($\beta 2i$) und LMP7 ($\beta 5i$) und damit eine *de novo* Formation von Immunproteasomen (s. Kapitel 1.4). In stimulierten Zellen werden somit die β -Proteine sowohl der drei konstitutiven als auch der drei Immununtereinheiten exprimiert. Das Expressionsniveau von konstitutiven bzw. Immunproteasomen muß also auf der Ebene der Assemblierung reguliert werden, um zu verhindern, dass ausschließlich gemischte Proteasomen nach einem Cytokin-Stimulus generiert werden (De, et al., 2003; Fruh, et al., 1994; Griffin, et al., 1998; Kingsbury, et al., 2000). Der bevorzugt kooperative Einbau entweder ausschließlich von konstitutiven oder ausschließlich von Immununtereinheiten beruht größtenteils auf den unterschiedlichen Prosequenzen und führt zur Formation homogener 20S-Proteasomen (De, et al., 2003; Kingsbury, et al., 2000). Da

dieser kooperative Einbau jedoch nicht absolut stringent erfolgt, werden auch intermediäre Proteasomen mit sowohl konstitutiven als auch Immununtereinheiten generiert (Dahlmann, et al., 2001; Dahlmann, et al., 2000; De, et al., 2003; Kingsbury, et al., 2000).

Für die Immunoproteasom-Assemblierung wurde eine frühe und kooperative Inkorporation der Proformen von MECL-1 ($\beta 2i$) und LMP2 ($\beta 1i$) beschrieben (Griffin, et al., 1998; Groettrup, et al., 1997). Interessanterweise unterscheidet sich somit die Reihenfolge der Untereinheiten-Inkorporation bei konstitutiven und Immuno-Precursorkomplexen (Nandi, et al., 1997). Bei der Formation konstitutiver 20S-Proteasomen ist die $\beta 1$ -Untereinheit eine der spät in den Komplex dirigierten Untereinheiten (vgl. Kapitel 1.5.3). Die homologe Untereinheit LMP2 ($\beta 1i$) wird jedoch früh in Immuno-Precursorkomplexe inkorporiert und legt den naszierenden Komplex auf ein späteres Immunoproteasom fest (Griffin, et al., 1998; Kingsbury, et al., 2000). In diesen Precursorkomplex mit den Immununtereinheiten MECL-1 und LMP2 kann ausschließlich LMP7 ($\beta 5i$) effizient inkorporiert werden, die konstitutive $\beta 5$ -Untereinheit (MB1) hingegen nicht (Griffin, et al., 1998; Kingsbury, et al., 2000; Schmidt, et al., 1999). LMP7 ($\beta 5i$) ist also nicht für die Inkorporation der beiden anderen Immununtereinheiten essentiell, sondern ausschließlich für eine effiziente Reifung des kompletten Immuno-Precursorkomplexes (vgl. Kapitel 1.6). Im Gegensatz zu MB1 ($\beta 5$), das nicht in einen Immuno-Precursorkomplex dirigiert werden kann, ist LMP7 ($\beta 5i$) nicht absolut restringiert. Diese Immununtereinheit wird zwar bevorzugt in Immuno-Precursorkomplexe inkorporiert, kann aber auch mit geringerer Effizienz in konstitutive Precursorkomplexe (mit pro- $\beta 1$ und pro- $\beta 2$) eingebaut werden (De, et al., 2003; Kingsbury, et al., 2000). LMP7 ($\beta 5i$) ist somit Komponente von hauptsächlich Immunoproteasomen, aber auch von intermediären 20S-Komplexen.

Der durch die Beschreibung des kooperativen Einbaus vermutete Einfluss der Prosequenzen auf die Assemblierung homogener 20S-Proteasomen wurde durch weitere Experimente mit chimären β -Proformen bestätigt. So führte sowohl der homologe Austausch der LMP7 ($\beta 5i$)-Prosequenz gegen die Prosequenz von MB1 ($\beta 5$) als auch die umgekehrte Kombination zu einer spiegelbildlichen Inkorporation der chimären Proformen (proMB1_LMP7 bzw. proLMP7_MB1) in die entsprechenden Precursorkomplexe (Kingsbury, et al., 2000). Auch der Austausch des Propeptids der MECL-1 ($\beta 2i$) –Untereinheit durch die Z ($\beta 2$)-Prosequenz resultierte in einem bevorzugten Einbau der Chimäre (proZ_MECL-1) in konstitutive Precursorkomplexe (De, et al., 2003). Ein Ersatz der LMP2 ($\beta 1i$)-Prosequenz durch das nicht homologe Propeptid von LMP7 ($\beta 5i$) verhinderte nicht den Einbau des resultierenden Proproteins proLMP7-LMP2 an der korrekten Position innerhalb des naszierenden Proteasoms (Schmidtke, et al., 1996). Die reziproke Kombination (proLMP2-LMP7) resultierte in einer Inkorporation an der LMP7-Position (Witt, et al., 2000). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Prosequenz allein nicht die Position der Untereinheit determiniert. Allerdings resultierten beide Prosequenz-Transfers in einer verzögerten und nur partiellen Maturierung. Das gleiche Ergebnis wurde bei einer Deletion des gesamten Propeptids von LMP2

(Δ proLMP2) erzielt (Schmidt, et al., 1999). Zur Bedeutung der Prosequenz von LMP7 (β 5i) gibt es widersprüchliche Angaben (Cerundolo, et al., 1995; Witt, et al., 2000). Eine LMP7-Propeptid-Deletion (Δ proLMP7) inhibiert den Einbau von LMP7 (β 5i) nicht vollständig, sondern verzögert deutlich die Proteasom-Maturierung und führt damit zu einer Akkumulation von Precursorkomplexen (Witt, et al., 2000). Auf die Bedeutung der LMP7 (β 5i)-Prosequenz für die Inkorporation in naszierende Immuno-Precursorkomplexe wird in Kapitel 1.6 näher eingegangen.

Die Funktion putativer Hilfsfaktoren bei der Immunoproteasom-Assemblierung ist bisher nur ungenügend charakterisiert (vgl. auch Kapitel 1.5.6). So wurde zunächst vermutet, dass die Formation von murinen Immunoproteasomen von der Assistenz der ebenfalls IFN γ -induzierbaren Proteasomaktivatoren PA28 α und β abhängt (Preckel, et al., 1999). Diese Hypothese wurde jedoch durch andere Untersuchungen entkräftet (Murata, et al., 2001).

1.5.6 Akzessorische Faktoren der eukaryotischen 20S-Biogenese

Die Assemblierung und Maturierung komplexer eukaryotischer Proteasomen ist auf die Unterstützung akzessorischer Faktoren angewiesen (vgl. Kapitel 1.5.3). Das zuerst für *S. cerevisiae* beschriebene akzessorische 17kDa-Protein UMP1 (*Ubiquitin-mediated proteolysis*) spielt eine wesentliche Rolle bei der Maturierung von 20S-Proteasomen (Ramos, et al., 1998). UMP1 ist eine Komponente von 'Hemi'-Precursorkomplexen (vgl. Kapitel 1.5.3), gelangt nach deren Dimerisierung in die zentrale Kammer des reifenden Proteasoms und stellt nach der vollständig abgeschlossenen Maturierung das erste Substrat des gereiften Proteasoms dar. Im Wildtyp ist UMP1 ein sehr kurzlebiges Protein. In Hefemutanten mit katalytisch inaktiven Proteasomen verbleibt UMP1 eingeschlossen in Precursorkomplexen und wird dadurch stabilisiert. Eine *Ump1*-Deletion in Hefen ist zwar nicht lethal, die Zellen zeichnen sich aber durch ein beeinträchtigtes Wachstum und eine hohe Sensitivität gegenüber verschiedenen Stressbedingungen aus. Dieser Phänotyp hat seine Ursache in einer verlangsamten und ineffizienten Maturierung der 20S-Proteasomen, was in einem dramatischen Anstieg an Precursorkomplexen resultiert. Folglich ist der Maturierungsfaktor UMP1 in Hefe zwar nicht essentiell, wirkt aber unterstützend auf die Proteasommaturierung.

Aufgrund von genetischen Studien wurde eine funktionelle Assoziation von UMP1 und der Prosequenz von β 5 postuliert. Die Lethalität der Deletionsmutante für die Prosequenz von β 5 (Δ pro- β 5; vgl. 1.5.4.1) konnte durch eine gleichzeitige Deletion von *Ump1* reprimiert werden. Wurde allerdings in diesem Stamm (Δ *Ump1*/ Δ pro β 5) die UMP1-Expression induziert, war dies wiederum lethal. Somit wurde geschlussfolgert, dass das Propeptid von β 5 essentiell für die UMP1-vermittelte Proteasommaturierung ist. UMP1 ist also möglicherweise ein spezifisch mit Propeptiden interagierender Maturierungsfaktor, der dadurch im Precursorkomplex eine für die Maturierung günstige Konformation vermittelt (Ramos, et al., 1998). Bisher konnte die

Interaktion von UMP1 an die Proform von $\beta 5$ aufgrund von Hefe 2-Hybrid-Experimenten nachgewiesen werden (Cagney, et al., 2001). Ob dabei UMP1 ausschließlich an das Propeptid von $\beta 5$ bindet, ist unklar.

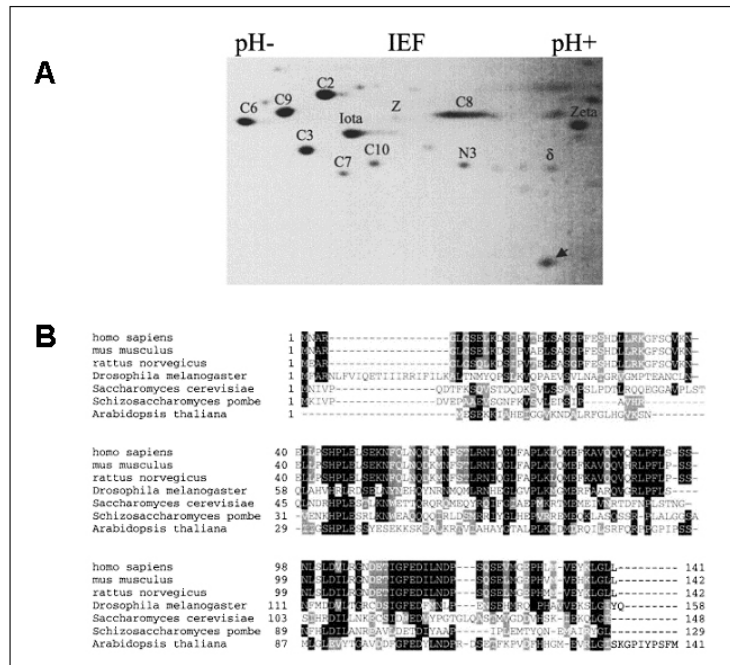


Abbildung 5: Der humane Maturierungsfaktor POMP ist Bestandteil von Precursorkomplexen. **A** zeigt ein Coomassie-gefärbtes 2D-Gel von 16S-Precursorkomplexen, die aus T2 LMP2T1A-Zellen isoliert wurden. Diese Zelllinie ist aufgrund der verminderten Maturierungseffizienz durch eine Akkumulation von Precursorkomplexen gekennzeichnet (Schmidtke, et al., 1996). POMP ist mit einem Pfeil markiert (C2: $\alpha 6$, C9: $\alpha 3$, C8: $\alpha 7$, Z: $\beta 2$, C6: $\alpha 4$, Iota: $\alpha 1$, Zeta: $\alpha 5$, C3: $\alpha 2$, C10: $\beta 3$, C7: $\beta 4$, N3: $\beta 7$, δ : $\beta 1$). **B** zeigt die Sequenzüberlagerung verschiedener POMP-homologer Proteine [Abbildung aus: (Witt, et al., 2000)].

Die *mammalia* Homologe von UMP1 wurden nahezu zeitlich durch mehrere Arbeitsgruppen beschrieben und benannt: murines Proteasasembelin oder mUMP1 (Burri, et al., 2000; Griffin, et al., 2000) bzw. das humane Proteasasembelin, hUMP1 oder POMP (Burri, et al., 2000; Witt, et al., 2000). Allerdings wurde das damals noch unbekannte Protein POMP (*proteasome maturation protein*) schon in zahlreichen älteren Publikationen als Bestandteil von Precursorkomplexen abgebildet (Frentzel, et al., 1994; Nandi, et al., 1997). Wie Abbildung 5 zeigt, sind die Maturierungsfaktoren der Eukaryoten mit ca. 95% Identität stark konserviert, während das Hefe-Homolog UMP1 den *mammalia* Proteinen mit max. 30% Identität nur schwach ähnelt (Burri, et al., 2000; Griffin, et al., 2000; Witt, et al., 2000). Analog zu seinem Hefehomolog ist der *mammalia* Maturierungsfaktor POMP ausschließlich Bestandteil von Assemblierungsintermediaten mit β -Proteinen und kann nicht in reifen 20S-Proteasomen detektiert werden. Nur in T2-Zell-Derivaten mit verzögerter Maturierung konnte ein starkes Proteinsignal für POMP beobachtet werden (Griffin, et al., 2000; Witt, et al., 2000). Somit scheint POMP auch in *mammalia* Zellen ein kurzlebiges Protein zu sein.

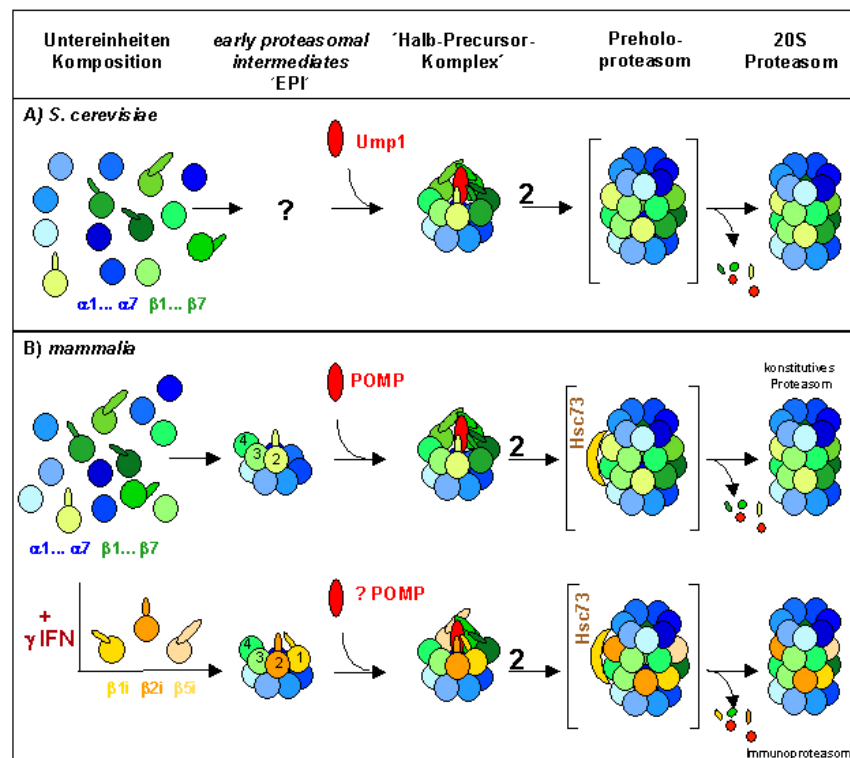


Abbildung 6: Biogenese-Modelle für eukaryotische 20S-Proteasomen mit je mindestens sieben verschiedenen α - und β -Untereinheiten. Fünf Stadien der 20S-Assemblierung in *S.cerevisiae* (A) bzw. *mammalia* (B) sind angegeben: freie Untereinheiten (α -Untereinheiten in blau, β -Untereinheiten in grün; Immunountereinheiten nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation in orange), frühe proteasomale Intermediate (EPIs), sogenannte 'Halb-Precursorkomplexe' (bestehend aus je einem Heptamerring von α - und pro β -Untereinheiten), die zu inaktiven Preholoproteasomen dimerisieren sowie reife 20S-Proteasomen. Die eukaryotische Proteasom-Assemblierung bzw. -Maturierung wird durch verschiedene Hilfsfaktoren wie Ump/POMP-Proteine oder Chaperone der HSP70-Familie vermittelt [Abbildung nach: (Heinemeyer, et al., 2004)].

Interessanterweise wird die Expression der POMP-mRNA, ebenso wie die der proteasomalen Immunountereinheiten, nach einem $\text{IFN}\gamma$ -Stimulus sowohl in murinen als auch in humanen Zellen mindestens zweifach induziert (Burri, et al., 2000; Witt, et al., 2000). Ob POMP allerdings auch auf Proteinebene induziert wird und ob POMP auch Bestandteil von homogenen Immuno-Precursorkomplexen ist, konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Kingsbury *et al.* warfen sogar die Frage auf, ob evtl. ein zweiter Maturierungsfaktor in Vertebraten existieren könnte, der spezifisch die Maturierung von Immunoproteasomen unterstützen könnte (Kingsbury, et al., 2000). Andererseits wurde die Hypothese aufgestellt, dass $\text{IFN}\gamma$ neben der gesteigerten Expression der Immunountereinheiten auch die Proteinexpression von POMP induzieren und daraus eine schnellere *de novo* Formation von Immunoproteasomen resultieren könnte (Burri, et al., 2000).

Es wurde ebenfalls diskutiert, dass *mammalia* POMP an die Prosequenzen der Immunountereinheiten binden könnte. Da die Prosequenzen von konstitutiven und Immunountereinheiten jedoch nicht so stark konserviert sind, wie die Sequenzen der reifen

Untereinheiten (vgl. Kapitel 1.6), könnte sich daraus eine Erklärung ableiten, warum die POMP-Homologe in Hefe und Vertebraten so unterschiedlich sind. Allerdings stand der Beweis, dass POMP wirklich an die Prosequenzen von konstitutiven bzw. Immununtereinheiten bindet, auch für *mammalia* Proteasomen noch aus. Im humanen System scheint zumindest die Prosequenz von $\beta 5i$ (LMP7) entbehrlich für die Interaktion von POMP mit proteasomalen Precursorkomplexen zu sein (Witt, et al., 2000). Der genaue Einfluß von POMP auf die Assemblierung und Maturierung sowohl von konstitutiven als auch von Immunoproteasomen sowie deren Regulationsmechanismen sind bisher nur ungenügend charakterisiert. Die in den Kapiteln 1.5.2.2 bis 1.5.6 beschriebenen Mechanismen der Proteasom-Assemblierung in Eukaryoten sind schematisch in Abbildung 6 zusammengefasst.

1.6 Das humane *PSMB8* (*LMP7*) Gen und seine Besonderheiten

LMP7 ($\beta 5i$) zählt zu den proteasomalen Immununtereinheiten (vgl. Kapitel 1.4) und wird in humanen Zellen durch das *PSMB8*-Gen innerhalb des MHC II - Locus' auf Chromosom 6 codiert (Abbildung 7A). Der MHC II - Locus umfasst u.a. auch das *PSMB9*-Gen für die Immununtereinheit LMP2 ($\beta 1i$) und die Gene für die TAP-Transporter 1 und 2 (Brown, et al., 1991; Fruh, et al., 1992; Glynne, et al., 1991; Kelly, et al., 1991; Ortiz-Navarrete, et al., 1991). Das *PSMB10*-Gen für die dritte Immununtereinheit MECL-1 ($\beta 2i$) liegt nicht im MHC II - Locus. Im Gegensatz zu anderen bekannten *LMP7*-Genen mit sechs Exons, wie das der Maus oder der Ratte (Aki, et al., 1994; Meinhardt, et al., 1993), umfasst das humane *PSMB8*-Gen sieben Exons (Fruh, et al., 1992; Glynne, et al., 1993). Das erste Exon des murinen *LMP7*-Gens korrespondiert mit dem zweiten Exon (E2) des humanen *PSMB8*-Gens. Das humane erste Exon (E1) hat keine homologe Entsprechung im murinen Gen (Meinhardt, et al., 1993). Deshalb werden die zwei ersten humanen Exons auch als Exon1a bzw. Exon1b bezeichnet (Glynne, et al., 1993; Meinhardt, et al., 1993).

Vom humanen *PSMB8*-Gen werden zwei verschiedene mRNAs infolge von alternativem ersten Exon *usage* transkribiert, die sich ausschließlich im jeweils ersten Exon unterscheiden und deswegen LMP7_E1 bzw. LMP7_E2 genannt werden (Abbildung 7B). Das vorherrschende *PSMB8*-Genprodukt in humanen Zellen ist die LMP7_E2-mRNA (Fruh, et al., 1992). Auf Proteinebene wurde bisher *in vivo* ausschließlich die Expression von LMP7_E2 nachgewiesen (Glynne, et al., 1993). Nur nach einer Überexpression von LMP7_E1 in HeLa- bzw. T2-Zellen wurde eine schwache Proteinexpression dieser LMP7-Variante beobachtet (Griffin, et al., 1998; Yang, et al., 1995). Zunächst wurde davon ausgegangen, dass die LMP7_E1-mRNA *in vivo* möglicherweise kaum translatiert wird (Fruh, et al., 1992; Glynne, et al., 1993). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass das LMP7_E1-Protein aufgrund fehlender Inkorporation in naszierende Immuno-Precursorkomplexe *in vivo* sehr instabil ist (Griffin, et al.,

1998; Yang, et al., 1995). Die beiden resultierenden Proteine LMP7_E1 und LMP7_E2 weichen nur in den ersten zwei Dritteln ihrer Prosequenzen voneinander ab (in Abbildung 7B farblich gekennzeichnet), die maturierten Proteine wären identisch. Diese unterschiedlichen Bereiche der Prosequenz weisen keinerlei Sequenzverwandtschaft auf, während das Propeptid von LMP7_E2 dem des homologen Proteins MB1 ($\beta 5$) ähnelt (Abbildung 7C). Auch die jeweiligen vorhergesagten isoelektrischen Punkte für beide Prosequenz-Varianten sind sehr divergent (Glynne, et al., 1993). Möglicherweise verhindert der im Vergleich zur LMP7_E2-Prosequenz saure Charakter der LMP7_E1-Prosequenz den effizienten Einbau dieser Proteinvariante in Precursorkomplexe. Dies unterstreicht erneut die Bedeutung der korrekten Prosequenz proteasomaler β -Untereinheiten für deren effiziente Inkorporation und Prozessierung (vgl. Kapitel 1.5.4.1).

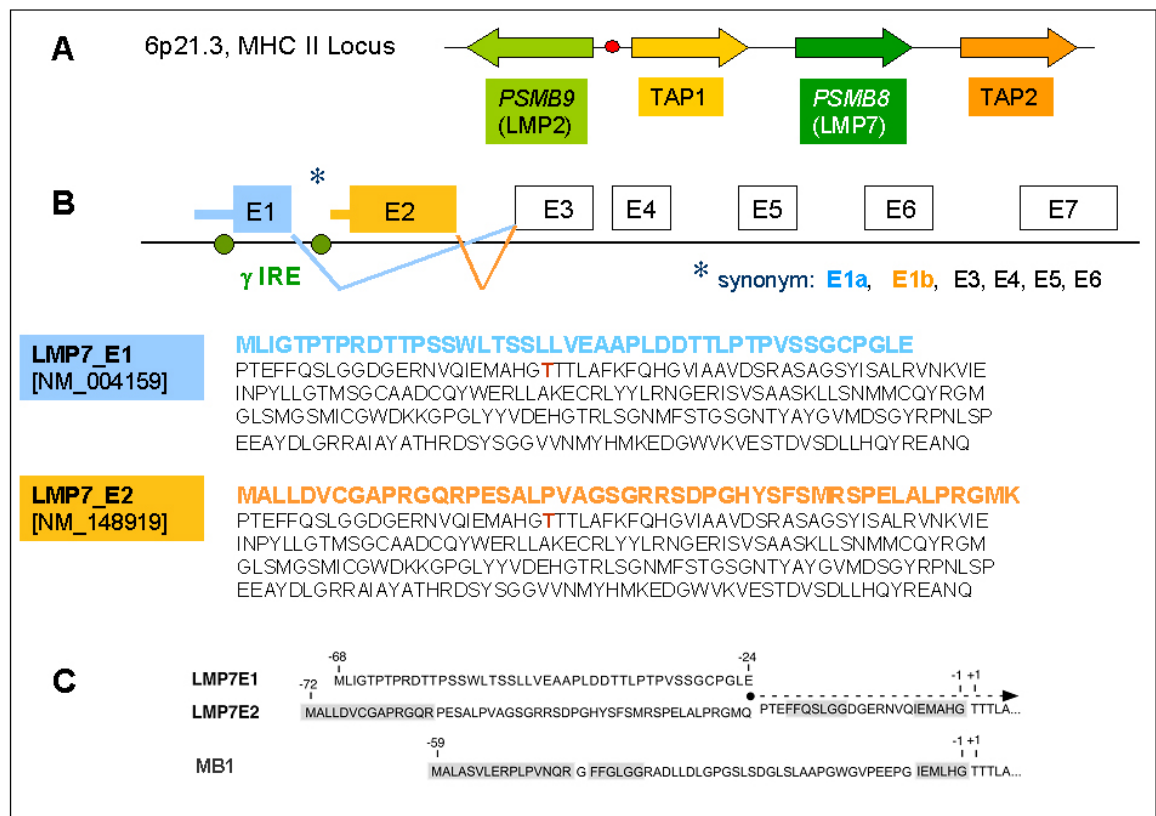


Abbildung 7: Die Organisation des humanen MHC II-Locus (A) und Produkte des *PSMB8*-Gens, codierend für die Immununtereinheit LMP7. B: Die zwei humanen LMP7-Transkripte E1 (NCBI-Eintrag NM_004159) bzw. E2 (NM_148919) resultieren aus alternativem ersten *exon usage* und codieren für Proteine, die sich im N-terminalen Abschnitt der Prosequenz unterscheiden (farblich markiert). Beide Proteine wären als gereifte $\beta 5i$ -Untereinheit LMP7 identisch (aktives Zentrum Thr1 in rot). C: Sequenzvergleich der Prosequenzen von LMP7_E1, LMP7_E2 ($\beta 5i$) und MB1 ($\beta 5$), das aktive Zentrum liegt an Position +1 [Abbildung aus (Kingsbury, et al., 2000)].

Im Gegensatz zu anderen Genen des MHC II -Locus ist *PSMB8* nur eingeschränkt polymorph (van Endert, et al., 1992). Neben verschiedenen Polymorphismen in Intron-Bereichen, die LMP7 A, B, C, D genannt werden (Ding, et al., 2001; Faucz, et al., 2000; Heward, et al., 1999; Lee, et al., 2001), wurde auch ein *single nucleotid polymorphism* (SNP) in der codierenden Sequenz beschrieben. Da dieser SNP (N₁₄₅, AS₄₉) in Exon 2 liegt, existieren von der Immun Untereinheit LMP7_E2 zwei Proteine mit einer Q/K-Aminosäurevariation innerhalb der Prosequenz (Abbildung 8). Verschiedene Publikationen beschrieben eine direkte Korrelation der LMP7-Allelfrequenzen mit der Anfälligkeit für verschiedene Erkrankungen (Fraile, et al., 1998; Naruse, et al., 2000; Prahalad, et al., 2001; Sugimoto, et al., 2002). Andere Studien hingegen konnten keinen signifikanten Einfluss der Allelfrequenzen auf die Pathogenese von z.B. Rheumatoider Arthritis feststellen (Maksymowych, et al., 1995; Vinasco, et al., 1998).

1.7 Stabilität und Abbau von 20S-Proteasomen

Die Stabilität von *mammalia* 20S-Proteasomen wurde bisher nur in wenigen Publikationen beschrieben. In der ersten *in vivo* Analyse wurde die Halbwertszeit von Proteasomen der Rattenleber mit ca. 12-15 Tagen angegeben (Tanaka and Ichihara, 1989). Allerdings wurde bereits in dieser Veröffentlichung diskutiert, dass dieser Wert u.U. zu hoch bemessen ist, da die Aktivität, die den Tieren verabreicht wurde, über einen längeren Zeitraum im Organismus inkorporiert werden konnte. Dieser Verdacht bestätigte sich durch eine der folgenden Untersuchungen, die eine Halbwertszeit von Rattenleber-Proteasomen mit acht Tagen angibt (Cuervo, et al., 1995). Die bisher einzige Untersuchung für humane Proteasomen belegte eine Halbwertszeit von 5 Tagen in HeLa-Zellen (Hendil, 1988). Eine wesentlich kürzere Halbwertszeit von 2 Tagen wurde für murine Leber-Proteasomen angegeben (Nandi, et al., 1997). Keine dieser Analysen untersuchte Immunoproteasomen, die möglicherweise eine zu konstitutiven 20S-Proteasomen unterschiedliche Stabilität aufweisen könnten. Ob sich eine Änderung zellulärer Bedingungen auf die Stabilität konstitutiver 20S-Proteasomen auswirkt, wurde bisher ebenfalls nicht untersucht. Es wurde zwar nachgewiesen, dass sich die Untereinheiten-Komposition prä-existenter konstitutiver Proteasomen nach einem IFN γ -Stimulus und der daraus resultierenden Immunoproteasom-Induktion in humanen Zellen nicht verändert, eine mögliche Beeinflussung der Stabilität wurde jedoch nicht untersucht (Aki, et al., 1994). Auch die Prozesse, die einen Abbau von reifen 20S-Proteasomen induzieren, sowie dessen Mechanismen sind bisher unbekannt. Ausschließlich in Lebern von hungrigen Ratten konnte eine Translokation von 20S-Proteasomen in das Lumen von Lysosomen nachgewiesen werden (Cuervo, et al., 1995). Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass Proteasomen u.U. entweder nach nicht selektiver Autophagie oder aufgrund eines spezifischen (chaperonvermittelten) Transports lysosomal degradiert werden könnten. Zumindest eine Inaktivierung von Proteasomen aufgrund des geringen lysosomalen pH-Wertes wird auch in einer weiteren Veröffentlichung als mögliche Vorstufe des Abbaus von Proteasomen vorgeschlagen (Wojcik and DeMartino, 2003).

1.8 Zielstellung dieser Arbeit

20S-Proteasomen sind als Bestandteil des Ubiquitin-Proteasom-Systems u.a. für die adaptive zelluläre Immunantwort von wichtiger Bedeutung. Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die differentiellen Regulationsmechanismen, die zur *de novo* Formation von konstitutiven bzw. Immunoproteasomen führen, weitgehend unbekannt. Zielstellung dieser Arbeit war die biochemische Analyse der Biogenese von konstitutiven und Immunoproteasomen in humanen Zellen. Dabei lag ein Schwerpunkt auf der initialen Komplexierung proteasomaler Komponenten, da hierfür keine gesicherten Erkenntnisse vorlagen. Spezifische Interaktionen zwischen jeweils zwei einzelnen proteasomalen Untereinheiten sollten mittels einer Hefe 2-Hybrid-Analyse untersucht werden. Zur weiteren Charakterisierung initialer Biogenesestadien von komplexen eukaryotischen Proteasomen sollte eine Methode zur Anreicherung früher proteasomaler Assemblierungsintermediate aus humanen Zellen etabliert werden. Die fortschreitende Komplexierung und die Reifung zu aktiven Proteasomen ist vermutlich von der Assistenz verschiedener Hilfsfaktoren abhängig. Der putative Maturierungsfaktor eukaryotischer 20S-Proteasomen POMP (*proteasome maturation protein*) stand im Focus der Untersuchungen. Es sollte geklärt werden, ob POMP gleichermassen in die Biogenese von konstitutiven und Immunoproteasomen involviert ist oder ob sich darin die Formation beider Komplexe unterscheiden könnte. Dadurch rückte die Analyse der Reifungskinetik sowohl von konstitutiven als auch von Immunoproteasomen ins Zentrum der Arbeit. Weiterhin sollte die Homöostase der Expression von 20S-Proteasomen in humanen Zellen untersucht werden. Dafür wurde die Stabilität von konstitutiven bzw. Immunoproteasomen in Abhängigkeit von der Cytokinstimulation humaner Zellen analysiert.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

In den folgenden Auflistungen sind nur verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien angegeben, die nicht zur Standardausstattung eines Labors gehören.

2.1 Geräte

<i>FACSCalibur</i> mit Software <i>CellQuest</i> / <i>CellQuestPro</i>	BD BIOSCIENCES, Heidelberg
Fluorimeter <i>bmG Fluostar</i> mit Software <i>EasyBase</i>	SLT LabInstruments, Crailsheim
FPLC <i>Äkta</i> mit Software <i>Unicorn 3.20</i>	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
Fraktionssammler <i>GradiFrac</i>	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
Hybridisierungskubator	GFL, Burgwedel
MonoQ_HR 5/5-FPLC-Säule	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
<i>PhastSystem</i>	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
Phosphorimager <i>FLA3000</i> Fujifilm mit Software <i>AIDA</i>	RAYTEST, Straubenhardt
Photometer <i>UltrospecIII</i>	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
RTS <i>ProteoMaster</i>	ROCHE, Mannheim
Thermocycler <i>Uno Thermoblock</i>	BIOMETRA, Göttingen
Ultrazentrifugen Beckman L-70 / L7-55	BECKMAN COULTER, Krefeld
Sorvall <i>UltraPro80</i>	KENDRO, Langenselbold
UV-Tisch <i>Macrovue UVIS</i> (Hoefer)	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

2.2.1 Chemikalien und Inhibitoren

Allgemeine Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von VWR International (ehemals MERCK, Darmstadt), SIGMA (Taufkirchen), ROTH (Karlsruhe), APPLICHEM (Darmstadt) bzw. SERVA (Heidelberg) bezogen. Gebrauchslösungen wurden bei Bedarf mit voll entsalztem Wasser aus einer „MilliQplus“ Filteranlage (MILLIPORE, Schwalbach) angesetzt und bei Bedarf autoklaviert.

Aminosäuren für Hefemedien	SERVA, Heidelberg
Ampicillin	ROTH, Karlsruhe
<i>Amplify</i> Fluorographic Reagent	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
<i>Blocking Reagent for nucleic acid hybridization / Detection</i> (Blockierung Northern Blot-Membran)	ROCHE, Mannheim
<i>CDP-Star, ready-to-use (Northern Detection)</i>	ROCHE, Mannheim
<i>Complete</i> Protease-Inhibitor-Cocktail	ROCHE, Mannheim
dNTP Mix (PCR-Nucleotide)	BIOCARTA, Hamburg / PEQLAB, Erlangen
DEAE Sephacel	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
Fluorogene Peptidsubstrate	BACHEM, Weil am Rhein
<i>Fugene 6</i> -Transfektionsreagenz	ROCHE, Mannheim
Geneticin (G418-Sulfate)	GIBCO / INVITROGEN, Karlsruhe

Hefe-Extrakt <i>BactoYeast Extract Difco</i>	BD BIOSCIENCES, Heidelberg
Interferon γ , human, rekombinant	ROCHE, Mannheim
MG-132 Proteasom-Inhibitor	MERCK Bio. / Calbiochem, Schwalbach
Milchpulver <i>Skim Milk Difco</i>	BD BIOSCIENCES, Heidelberg
NiNTA Agarose / NiNTA <i>magnetic beads</i>	QIAGEN, Hilden
Pepton <i>BactoPeptone Difco</i>	BD BIOSCIENCES, Heidelberg
Protein A-Sepharose CL-4B	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
Protein G-Agarose	ROCHE, Mannheim
Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat (<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>)	BIORAD, München
<i>RNasin</i> RNase-Inhibitor	PROMEGA, Mannheim
Toyopearl DEAE 650S	TOSOH Bioscience, Stuttgart
<i>Tran</i> ³⁵ S-Label Metabolic Labeling Reagent	MP BIOMEDICALS (ICN), Eschwege
<i>Yeast Nitrogen Base –AA/AS (DIFCO)</i>	BD BIOSCIENCES, Heidelberg
YPD Broth <i>Difco</i>	BD BIOSCIENCES, Heidelberg

2.2.2 Enzyme

DNA Polymerase I, <i>Large</i> (Klenow)-Fragment	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt
<i>Expand High Fidelity</i> PCR System	ROCHE, Mannheim
Enterokinase	ROCHE, Mannheim
Restriktionsendonucleasen	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt
Reverse Transkriptase M-MuLV ‘USB’	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
RNase A	SIGMA, Taufkirchen
SAP (<i>Shrimp</i> Alkalische Phosphatase)	ROCHE, Mannheim
T4 DNA Ligase	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt
<i>Taq</i> DNA Polymerase	ROCHE, Mannheim

2.2.3 Kits

<i>ECL Plus Western Blotting Detection Kit</i>	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
<i>DIG RNA Labeling Mix</i>	ROCHE, Mannheim
<i>Gel Drying Kit</i>	PROMEGA, Mannheim
<i>GFX - PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i>	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
<i>High Molecular Weight Calibration Kit for Native Electrophoresis</i>	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
<i>High Pure PCR Template Preparation Kit</i> (zur Isolation genomischer DNA aus humanen Zellen)	ROCHE, Mannheim
<i>High Pure RNA Isolation Kit</i> (Gesamt-RNA)	ROCHE, Mannheim
<i>pcDNA 3.1 Directional TOPO Expression Kit</i>	INVITROGEN, Karlsruhe
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN, Hilden
<i>Restriction Protease Factor Xa Cleavage and Removal Kit</i>	ROCHE, Mannheim
<i>RTS 100 bzw. 500 E. coli HY Kit</i>	ROCHE, Mannheim
<i>TnT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System</i>	PROMEGA, Mannheim
<i>Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit</i>	Molecular Probes / INVITROGEN, Karlsruhe

2.2.4 Verbrauchsmaterialien

Acryl-Küvetten	SARSTEDT, Nümbrecht
<i>Gel Blotting</i> -Papier GB002 ('Whatmann-Papier')	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Immobilon-P (PVDF-Membran, 0.45µM)	MILLIPORE, Schwalbach
KODAK Scientific Imaging Film X-OMAT UV	PMA BODE, Berlin
KODAK BioMAX Filme	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
Kryoröhrchen	GREINER, Frickenhausen
Mikrotiter-Platten ('FIA', 96well, schwarz)	GREINER, Frickenhausen
Nylonmembran (positiv geladen)	ROCHE, Mannheim
Schalen für Bakterien-/ Hefeplatten	GREINER, Frickenhausen
sterile 'Falcon'-Röhrchen 15 / 50ml	GREINER, Frickenhausen
sterile Pipetten	SARSTEDT, Nümbrecht
Sterilfilter 4.5, 0,2µm	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Zellkulturschalen, -flaschen, 'well-Plates'	GREINER, Frickenhausen

2.3 Oligonukleotide

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche Plasmide, codierend für verschiedene Fusionsproteine von humanen β -Untereinheiten des 20S-Proteasoms, generiert. Dafür wurden Oligonukleotide designet, die sich in den hybridisierenden Bereichen von den NCBI-Datenbankeinträgen der zugehörigen mRNAs ableiteten (s. Tabelle 1).

In Tabelle 2 sind die Bezeichnungen und 5'→ 3'-Sequenzen der in dieser Arbeit zur Klonierung bzw. Sequenzierung benutzten Oligonukleotide aufgeführt. Bei sog. „Ankerprimern“ für die Klonierung, welche nur partiell mit der Matrize hybridisieren (ca. 20 Nucleotide) und ebenfalls die Erkennungssequenz für Restriktionsendonucleasen beinhalten, sind diese Schnittstellensequenzen fett gedruckt. Stromaufwärts davon (5') befinden sich zusätzliche, ebenfalls nicht hybridisierende Nucleotide (kursiv), die nach „*Cleavage Close to the End of DNA Fragments*“ (s. Liste im Anhang des NEB-Kataloges) vor die entsprechende Schnittstelle einer Restriktionsendonuclease eingefügt wurden, um die Aktivität des Restriktionsenzym zu steigern, da diese deutlich erhöht ist, wenn sich die Schnittstelle in einer Umgebung von mindestens 4 Nucleotiden befindet (Muelhardt, 1999).

Alle in der Arbeit verwendeten Oligonucleotide (10nmol) wurden von der BIOTEZ BERLIN-BUCH GMBH synthetisiert und per Gel-Filtration gereinigt. Alle Primer wurden zu einer 50µM Lösung in sterilem, destilliertem Wasser aufgenommen.

Tabelle 1: Bezeichnung, Synonyme und NCBI *Accession#* der mRNAs bzw. der Proteine humaner proteasomaler Untereinheiten, die im Rahmen dieser Arbeit in verschiedene Plasmide kloniert wurden.

PSM-Nomenklatur	Trivialname	NCBI Nucleotid-#	NCBI Protein-#
PSMA1	$\alpha 6$	NM_002786	NP_002777
PSMA2	$\alpha 2$	NM_002787	NP_002778
PSMA3	$\alpha 7$	NM_002788	NP_002779
PSMA4	$\alpha 3$	NM_002789	NP_002780
PSMA5	$\alpha 5$	NM_002790	NP_002781
PSMA6	$\alpha 1$	NM_002791	NP_002782
PSMA7	$\alpha 4$	NM_002792	NP_002783
PSMB1	$\beta 6$	NM_002793	NP_002784
PSMB2	$\beta 4$	NM_002794	NP_002785
PSMB3	$\beta 3$	NM_002795	NP_002786
PSMB4	$\beta 7$	NM_002796	NP_002787
PSMB5	$\beta 5$, MB1	NM_002797	NP_002788
PSMB6	$\beta 1$, δ	NM_002798	NP_002789
PSMB7	$\beta 2$, Z	NM_002799	NP_002790
PSMB8_1	Transkriptvar.LMP7_E1	NM_004159	NP_004150
PSMB8_2	$\beta 5i$, LMP7_E2	NM_148919	NP_683720
PSMB9	$\beta 1i$, LMP2	NM_002800	NP_002791
PSMB10	$\beta 2i$, MECL-1	NM_002801	NP_002792
POMP	hUMP	AF125097	AAD39914

Tabelle 2: Bezeichnung und Sequenz der genutzten Oligonukleotide. Zur Abgrenzung von den hybridisierenden Bereichen (unformatierter Text) sind die sog. 5'-Überhänge und eingeschobene Basen (zur Erhaltung des Leserahmens) kursiv und die Erkennungssequenzen der entsprechenden Restriktionsenzyme fett markiert. Der Übersichtlichkeit wegen wurden die Plasmide, in die die Inserts einkloniert wurden, wie folgt abgekürzt: I (pIVEX 2.4a bzw. pIVEX 2.3-MCS), C (pACT2), S (pAS 2-1), D (pcDNA3.1D/V5-His-TOPO), F (Fusionsprotein Propeptid + AF β). Primer für die genomische Sequenzierung des humanen PSMB8-Locus sind mit 'genom.Seq.' abgekürzt. Die reverse-Oligonukleotide, die zur RNA-Sonden-Herstellung ('RNA-Sonde') genutzt wurden, besitzen eine T7 Promotor-Sequenz, die fett markiert ist.

Primer-Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Bemerkungen
PSMB1_5' NotI	AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG TTG TCC TCT ACA GCC AT	Klonierung I
PSMB1_5' BamHI	CGC GGA TCC GCA TGT TGT CCT CTA CAG CCA T	Klonierung C, S
PSMB1_3' XhoI	CCG CTC GAG TCA GTC CTT CCT TAA GGA AA	Klonierung I, C, S
PSMB2_5' NotI	AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG GAG TAC CTC ATC GGT AT	Klonierung I
PSMB2_5' BamHI	CGC GGA TCC GCA TGG AGT ACC TCA TCG GTA T	Klonierung C, S
PSMB2_3' XhoI	CCG CTC GAG TTA GGA GCC CTG TTT GGG GA	Klonierung I, C, S
PSMB3_5' NotI	AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG TCT ATT ATG TCC TAT AA	Klonierung I
PSMB3_5' XmaI	TCC CCC CGG GGA TGT CTA TTA TGT CCT ATA A	Klonierung C, S
PSMB3_3' XhoI	CCG CTC GAG TTA GTC CAT TCG GGC CTT CA	Klonierung I, C, S
PSMB4_5' NotI	AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG GAA GCG TTT TTG GGG TC	Klonierung I
PSMB4_5' XmaI	TCC CCC CGG GGA TGG AAG CGT TTT TGG GGT C	Klonierung C, S
PSMB4_3' XhoI	CCG CTC GAG TCA TTC AAA GCC ACT GAT CA	Klonierung I, C, S
PSMB5_5' NotI	AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG GCG CTT GCC AGC GTG TT	Klonierung I
PSMB5_5' XmaI	TCC CCC CGG GGA TGG CGC TTG CCA GCG TGT T	Klonierung C, S
PSMB5_3' XhoI	CCG CTC GAG TCA GGG GGT AGA GCC ACT AT	Klonierung I, C, S
PSMB6_5' NotI	AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG GCG GCT ACC TTA CTA GC	Klonierung I
PSMB6_5' BamHI	CGC GGA TCC GCA TGG CGG CTA CCT TAC TAG	Klonierung C, S
PSMB6_3' XhoI	CCG CTC GAG TCA GGC GGG TGG TAA AGT GG	Klonierung I, C, S
PSMB7_5' NotI	AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG GCG GCT GTG TCG GTG TA	Klonierung I
PSMB7_5' BamHI	CGC GGA TCC GCA TGG CGG CTG TGT CGG TGT A	Klonierung C, S
PSMB7_3' XhoI	CCG CTC GAG TCA GGA AGT GTC CAT TGT TT	Klonierung I, C, S
PSMB8_5' NotI	AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG GCG CTA CTA GAT GTA TG	Klonierung I
PSMB8_5' BamHI	CGC GGA TCC GCA TGG CGC TAC TAG ATG TAT G	Klonierung C, S
PSMB8_3' XhoI	CCG CTC GAG TTA TTG ATT GGC TTC CCG GT	Klonierung I, C, S
PSMB9_5' NotI	AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG CTG CGG GCG GGA GCA CC	Klonierung I
PSMB9_5' BamHI	CGC GGA TCC GCA TGC TGC GGG CGG GAG CAC C	Klonierung C, S
PSMB9_3' XhoI	CCG CTC GAG TCA CTC ATC ATA GAA TTT TG	Klonierung I, C, S
PSMB10_5' NotI	AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG CTG AAG CCA GCC CTG GA	Klonierung I
PSMB10_5' BamHI	CGC GGA TCC GCA TGC TGA AGC CAG CCC TGG A	Klonierung C, S
PSMB10_3' XhoI	CCG CTC GAG TTA CTC CAC CTC CAT AGC CT	Klonierung I, C, S
PSMB5_ΔPro_5' NotI	AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG ACA ACC ACC CTG GCC TTC AAG	Klonierung I
PSMB8_ΔPro_5' NotI	AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG ACC ACC ACG CTC GCC TTC AAG	Klonierung I
LMP7_E1_MLIG	TGG TTT TGT AAA GTG ATG	RT-PCR E1LMP7
LMP7_E2_MALL	GGG TGC TGG GCG GTC ATG	RT-PCR E2LMP7
5'LMP7_E1_MLIG_TOPO	CAC CAT GCT CAT AGG AAC C	Klonierung D
5'LMP7_E2_MALL_TOPO	CAC CAT GGC GCT ACT AGA T	Klonierung D
3'LMP7_E1/2_TOPO	GGC TAG GCC TCT TCT	Klonierung D
5'_ProLMP7_E2_NdeI	GGA ATT CCA TAT GGC GCT ACT AGA TGT A	Klonierung F
3'_ProLMP7_E2_KpnI	GGG GTA CCA TGG GCC ATC TCA AT	Klonierung F
3'_Xho_AF Beta	CCG CTC GAG TTA TTT CCT GAA CTT GGC	Klonierung F
5'_PSMB8_PromE1_genom	TTT TCA GCT GCG GAT GTC TCC	genom. Seq.
3'_PSMB8_StartE2_genom	CAT CTA GTA GCG CCA TGA CCG	genom. Seq.
5'_PSMB8_I1_genom	GCT TTC GCT TTC ACT TCC TCC	genom. Seq.
3'_PSMB8_E3_genom	CTC CAT GCT GGA ACT TGA AGG	genom. Seq.
5'UTR_LMP7_E1	GGA GCA ACG CTA GGA AGG GCG	RNA-Sonde
3'E1_LMP7_Sonde	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AGG CCC GGG CAT CCG CTG GA	RNA-Sonde
5'UTR_LMP7_E2	CTC CGA GAG CGG ACA GAT CTC	RNA-Sonde
3'E2_LMP7_Sonde	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT GCC ATG GGC CAT CTC AAT CT	RNA-Sonde
oligo(dT)	TTT TTT TTT TTT TTT TTT	RT (cDNA)

Tabelle 3: Bezeichnung und Eigenschaften der in dieser Arbeit generierten bzw. genutzten *in vitro*- und bakteriellen Expressionsvektoren. Die „ΔHis“-Konstrukte wurden generiert, indem die Inserts durch Restriktion aus den bereits klonierten und mittels Sequenzierung bestätigten pIVEX 2.4a-Konstrukten herausgeschnitten und in den pIVEX 2.3_MCS-Vektor ligiert wurden, indem der C-terminale His₆-Tag durch Restriktion mit NotI / BamHI entfernt wurde.

Kurzbezeichnung	Insert	Klonierungsschnittstellen	Plasmid	MCS Schnittstellen	Bemerkungen
B1 I 10	B1 / β6	NotI / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	N-term. His ₆ -Tag
B2 I 3	B2 / β4	NotI / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	N-term. His ₆ -Tag
B3 I 2	B3 / β3	NotI / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	N-term. His ₆ -Tag
B4 I 2	B4 / β7	NotI / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	N-term. His ₆ -Tag
B5 I 2	B5 / β5 / MB1	NotI / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	N-term. His ₆ -Tag
B6 I 4	B6 / β1 / δ	NotI / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	N-term. His ₆ -Tag
B7 I 9	B7 / β2 / Z	NotI / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	N-term. His ₆ -Tag
B8 I 2	B8 / β5i, LMP7	NotI / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	N-term. His ₆ -Tag
B9 I 3	B9 / β1i, LMP2	NotI / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	N-term. His ₆ -Tag
B10 I 3	B10 / β2i, MECL-1	NotI / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	N-term. His ₆ -Tag
B1 I 1_ΔHis	B1 / β6	NotI / BamHI	pIVEX 2.3_MCS	NotI / BamHI	ohne Tag
B2 I 1_ΔHis	B2 / β4	NotI / BamHI	pIVEX 2.3_MCS	NotI / BamHI	ohne Tag
B3 I 7_ΔHis	B3 / β3	NotI / SmaI	pIVEX 2.3_MCS	NotI / Blunt [BamHI]	ohne Tag
B4 I 3_ΔHis	B4 / β7	NotI / SmaI	pIVEX 2.3_MCS	NotI / Blunt [BamHI]	ohne Tag
B5 I 3_ΔHis	B5 / β5 / MB1	NotI / SmaI	pIVEX 2.3_MCS	NotI / Blunt [BamHI]	ohne Tag
B6 I 1.2_ΔHis	B6 / β1 / δ	NotI / BamHI	pIVEX 2.3_MCS	NotI / BamHI	ohne Tag
B7 I 4_ΔHis	B7 / β2 / Z	NotI / BamHI	pIVEX 2.3_MCS	NotI / BamHI	ohne Tag
B8 I 4_ΔHis	B8 / β5i, LMP7	NotI / BamHI	pIVEX 2.3_MCS	NotI / BamHI	ohne Tag
B9 I 4_ΔHis	B9 / β1i, LMP2	NotI / BamHI	pIVEX 2.3_MCS	NotI / BamHI	ohne Tag
B10 I 6_ΔHis	B10 / β2i, MECL-1	NotI / BamHI	pIVEX 2.3_MCS	NotI / BamHI	ohne Tag
B5ΔPro_I8	B5 / β5 / MB1	NotI / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	mature B5 Δ Propeptid, N-term. His ₆ -Tag
B8ΔPro_I2	B8 / β5i / LMP7	NotI / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	mature B8 Δ Propeptid, N-term. His ₆ -Tag
proMB1_AFβ I 4	ProMB1, m AFβ Chimäre	NotI / Kpn I / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	N-term. His ₆ -Tag
proLMP7_AFβ I 11	ProLMP7, m AFβ Chimäre	NotI / Kpn I / XhoI	pIVEX 2.4a	NotI / XhoI	N-term. His ₆ -Tag
His-POMP	POMP		pRSetA		N-term. His ₆ -Tag E. Krüger
POMP	POMP	NdeI / BamHI	pRSetA	NdeI / BamHI	ohne Tag E. Krüger
AF_β	<i>A. fulgidus</i> β		pRSetA		ohne Tag M. Groll

2.4 Plasmide

2.4.1 T7-Expressionsvektoren (IVTT, bakterielle Expression)

Zur *in vitro* Transkription/Translation (IVTT) von humanen Proteasom-Untereinheiten wurde entweder das RTS-System oder das TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System genutzt. Für beide Systeme fanden die IVTT-optimierten T7-Expressionsvektoren pIVEX 2.4a bzw. pIVEX 2.3_MCS aus der pIVEX-Familie (ROCHE) Anwendung. In dieser Arbeit genutzte Expressionsplasmide, die bereits im Labor vorlagen, sind Abkömmlinge des pRSetA-Vektors von INVITROGEN. Wurden die Plasmide im Rahmen der vorgelegten Arbeit nicht selbst kloniert, ist in Tabelle 3 unter Bemerkungen angegeben, wer diese Plasmide generiert hat.

2.4.2 Hefe-Expressionsvektoren

Tabelle 4: Bezeichnung und Eigenschaften der für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Hefe-Expressionsvektoren.

Konstrukt	Insert	Plasmid (Marker)	Klonierung durch
POMP_AD	POMP	pACT2 (LEU)	E. Witt
POMP_BD	POMP	pAS2-1 (TRP)	E. Witt
PSMA 1_AD	$\alpha 6$	pGAD424 (LEU)	S. Apcher
PSMA 2_AD	$\alpha 2$	pGAD424 (LEU)	S. Apcher
PSMA 3_AD	$\alpha 7$	pGAD424 (LEU)	S. Apcher
PSMA 4_AD	$\alpha 3$	pGAD424 (LEU)	S. Apcher
PSMA 5_AD	$\alpha 5$	pGAD424 (LEU)	S. Apcher
PSMA 6_AD	$\alpha 1$	pGAD424 (LEU)	S. Apcher
PSMA 7_AD	$\alpha 4$	pGAD424 (LEU)	S. Apcher
PSMA 1_BD	$\alpha 6$	pGBT9 (TRP)	S. Apcher
PSMA 2_BD	$\alpha 2$	pGBT9 (TRP)	S. Apcher
PSMA 3_BD	$\alpha 7$	pGBT9 (TRP)	S. Apcher
PSMA 4_BD	$\alpha 3$	pGBT9 (TRP)	S. Apcher
PSMA 5_BD	$\alpha 5$	pGBT9 (TRP)	S. Apcher
PSMA 6_BD	$\alpha 1$	pGBT9 (TRP)	S. Apcher
PSMA 7_BD	$\alpha 4$	pGBT9 (TRP)	S. Apcher

Um die Interaktion humaner proteasomaler Untereinheiten untereinander und mit dem Assemblierungsfaktor POMP zu untersuchen, wurde ein vereinfachter *Yeast Two Hybrid-Screen* durchgeführt. Dieses sogenannte *Interaction Trap*-Experiment ist ein Interaktionstest zweier bekannter Proteine und basierte auf dem MATCHMAKER-System von BD Biosciences / CLONTECH. Zur Expression von Fusionsproteinen mit einer N-terminalen

GAL4-DNA-Bindedomäne wurden die Vektoren pAS2-1 (β -Untereinheiten und Pomp) bzw. pGBT9 (α -Untereinheiten) genutzt (beide BD BIOSCIENCES). Ebenfalls von BD BIOSCIENCES stammten die Vektoren zur Expression von Fusionsproteinen mit einer N-terminalen GAL4-Aktivierungsdomäne: pACT2 (β -Untereinheiten und Pomp) sowie pGAD424 (α -Untereinheiten). Die Expressionsvektoren für humane β -Untereinheiten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt (s. Tabelle 5). Alle Plasmide für die α -Untereinheiten wurden von S. Apcher und J. Maitland, AG Prof. Mayer; University of Nottingham generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die POMP-Konstrukte wurden von Elke Witt, ehemals AG Prof. Kloetzel, erstellt (s. Tabelle 4).

Tabelle 5: Bezeichnung und Eigenschaften der in dieser Arbeit generierten Hefe-Expressionsvektoren.

Konstrukt- Bezeichnung	Insert	Klonierungs- schnittstellen	Plasmid (Transf.marker)	MCS Schnittstellen
B1_AD (B1C3)	B1 / β 6	BamHI / XhoI	pACT2 (LEU)	BamHI / XhoI
B2_AD (B2HC3)	B2 / β 4	BamHI / XhoI	pACT2 (LEU)	BamHI / XhoI
B3_AD (B3HC2)	B3 / β 3	XmaI / XhoI	pACT2 (LEU)	XmaI / XhoI
B4_AD (B4HC5)	B4 / β 7	XmaI / XhoI	pACT2 (LEU)	XmaI / XhoI
B5_AD (B5HC3)	B5 / β 5	XmaI / XhoI	pACT2 (LEU)	XmaI / XhoI
B6_AD (B6C2)	B6 / β 1	BamHI / XhoI	pACT2 (LEU)	BamHI / XhoI
B7_AD (B7C6)	B7 / β 2	BamHI / XhoI	pACT2 (LEU)	BamHI / XhoI
B8_AD (B8C8)	B8 / β 5i, LMP7	BamHI / XhoI	pACT2 (LEU)	BamHI / XhoI
B9_AD (B9C7)	B9 / β 1i, LMP2	BamHI / XhoI	pACT2 (LEU)	BamHI / XhoI
B10_AD (B10C19)	B10 / β 2i, MECL-1	BamHI / XhoI	pACT2 (LEU)	BamHI / XhoI
B1_BD (B1S6)	B1 / β 6	BamHI / Blunt	pAS2-1 (TRP)	BamHI / Blunt [SalI]
B2_BD (B2S3)	B2 / β 4	BamHI / Blunt	pAS2-1 (TRP)	BamHI / Blunt [SalI]
B3_BD (B3HS2)	B3 / β 3	XmaI / Blunt	pAS2-1 (TRP)	XmaI / Blunt [SalI]
B4_BD (B4TS2)	B4 / β 7	XmaI / Blunt	pAS2-1 (TRP)	XmaI / Blunt [SalI]
B5_BD (B5HS4)	B5 / β 5	XmaI / Blunt	pAS2-1 (TRP)	XmaI / Blunt [SalI]
B6_BD (B6S8)	B6 / β 1	BamHI / Blunt	pAS2-1 (TRP)	BamHI / Blunt [SalI]
B7_BD (B7S5)	B7 / β 2	BamHI / Blunt	pAS2-1 (TRP)	BamHI / Blunt [SalI]
B8_BD (B8S8)	B8 / β 5i, LMP7	BamHI / Blunt	pAS2-1 (TRP)	BamHI / Blunt [SalI]
B9_BD (B9S11)	B9 / β 1i, LMP2	BamHI / Blunt	pAS2-1 (TRP)	BamHI / Blunt [SalI]
B10_BD (B10S2)	B10 / β 2i, MECL-1	BamHI / Blunt	pAS2-1 (TRP)	BamHI / Blunt [SalI]

2.4.3 *mammalia* Expressionsvektoren

Um humane Zellen mit *mammalia* Expressionsvektoren (s. Tabelle 6) transient bzw. stabil zu transfizieren, wurden die entsprechenden Inserts in den pcDNA3.1D/ V5-His-TOPO-Vektor (INVITROGEN) laut Protokoll zum *pcDNA3.1 Directional TOPO Expression Kit* unter Verwendung von entsprechenden Primern (s. Tabelle 2) kloniert (ohne C-terminales His₆-tag).

Tabelle 6: Bezeichnung und Eigenschaften der in dieser Arbeit generierten oder genutzten *mammalia* Expressionsvektoren.

Konstrukt	Insert	Vektor	Klonierung über	Bemerkungen
LMP7_E1_TOPO	LMP7_E1	pcDNA3.1D/ V5-His	TOPO	ohne Tag
LMP7_E2 _Q TOPO	β5i / LMP7_E2_Q	pcDNA3.1D/ V5-His	TOPO	ohne Tag
LMP7_E2 _K TOPO	β5i / LMP7_E2_K	pcDNA3.1D/ V5-His	BamHI / Xho	ohne Tag
β-Gal	β-Galactosidase	pcDNA3		AG Prof. SCHEFFNER

2.5 DIG-markierte RNA-Sonden

Als DIG-markierte RNA-Sonden im Northern Blot wurden spezifische Sonden gegen POMP, LMP7 (gesamt), LMP7_E2 bzw. LMP2 genutzt. Die Herstellung dieser Sonden ist in Kapitel 2.11.2 beschrieben.

2.6 Antikörper

2.6.1 Primärantikörper für Immunoblots

Die Primärantikörper für Immunoblots und deren Eigenschaften sind in Tabelle 7 aufgeführt.

2.6.2 Sekundärantikörper für Immunoblots

'GAR': POD (HRP)-conjugated AffiniPure Goat-Anti-Rabbit IgG	DIANOVA, Hamburg
'RAM': POD (HRP)-conjugated AffiniPure Rabbit-Anti-Mouse IgG	DIANOVA, Hamburg
'GARat': POD (HRP)-conjugated Goat-Anti-Rat IgG	SIGMA, Taufkirchen

2.6.3 Antikörper für Immunfluoreszenz (FACS)

Maus_Anti-HLA_A2 IgG	One Lambda / BmT, Meerbusch
Maus_Anti-HLA_A11 IgG	One Lambda / BmT, Meerbusch
SekundärAk-FITC: Fluorescesin-conjugated AffiniPure	Dianova, Hamburg
F(ab') ₂ Fragment Goat-Anti-Mouse IgG	
FITC-conjugated monoclonal Ab Anti-ClassII (MHC) IgG2b	One Lambda / BmT, Meerbusch

2.6.4 Antikörper für Northern Blots

Maus_Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente	ROCHE, Mannheim
---	-----------------

Tabelle 7: Bezeichnung und Charakteristika der verwendeten Primärantikörper. Soweit nicht anders angegeben, entstammten die Antikörper der AG Prof. Kloetzel („Labor“ bzw. E.Krüger). Der C8-Antikörper wurde von Prof. J. Monaco, sämtliche von Prof. K. Hendil generierten Antikörper von Prof. B. Dahlmann freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Antikörper	spezifisch gegen	Spezies (mAk / pAk)	Verdünnung Western Blot	Bemerkungen / Herkunft
MP3	Σ 20S Proteasom	pAk (Kaninchen)	1:3000	„66024“ Labor
MP1	Σ 20S Proteasom	pAk (Kaninchen)	1:3000	Labor
C8	Precursorkonformation	pAk (Kaninchen)	1:2000	Monaco (Nandi, et al., 1997)
anti_ β 1	β 1 / δ	pAk (Kaninchen)	1:4000	Labor
anti_ β 1	β 1 / δ	mAk (Maus)	1:400	„MCP421“ Hendil
anti_ β 2	β 2 / Z	mAk (Maus)	1:1000	„MCP168“ Hendil
anti_ β 3		mAk (Maus)	1:500	„MCP102“ Hendil
anti_ β 4		pAk (Kaninchen)	1:400	„55F8“ Hendil
anti_ β 5	β 5 / MB1	pAk (Kaninchen)	1:4000	„774“ E.Krüger
anti_ β 6		pAk (Kaninchen)	1:500	„K93198“ Hendil
anti_ β 7		mAk (Maus)	1:5000	„MCP444“ Hendil
anti_LMP7	β 5i / LMP7	pAk (Kaninchen)	1:1000	Labor
anti_LMP2	β 1i / LMP2	pAk (Kaninchen)	1:1000	Labor
anti_MECL1	β 2i / MECL-1	pAk (Kaninchen)	1:1000	Labor
anti_POMP		pAk (Kaninchen)	1:1000	„Krü1“ E.Krüger
anti_ α 1		mAk (Maus)	1:50.000	„IB5“ Scherrer
anti_ α 2		mAk (Maus)	1:666	„MCP21“ Hendil
anti_ α 3		mAk (Maus)	1:1000	„MCP257“ Hendil
anti_ α 4		mAk (Maus)	1:500	„MCP34“ Hendil
anti_ α 5		mAk (Maus)	1:625	„MCP196“ Hendil
anti_ α 6		mAk (Maus)	1:5000	„MCP20“ Hendil
anti_ α 7		mAk (Maus)	1:2500	„MCP72“ Hendil
anti_PA28 α		pAk (Kaninchen)	1:1000	Labor
anti_PA28 β		pAk (Kaninchen)	1:1000	Labor
anti_HSP90		Ratte	1:1000	Stressgen/BIOMOL
anti_His		mAk (Maus)	1:2000 (BSA)	„RGS“ QIAGEN
anti_GFP		mAk (Maus)	1:1000	„B34“ BABCO

2.7 Längenstandards (“Marker”)

RNA-Standard

RNA-Längenstandard I Digoxigenin-markiert (0,3–6,9 kb) ROCHE, Mannheim

DNA-Standards

1kb DNA-Ladder

INVITROGEN, Karlsruhe

Lambda DNA *EcoRI* + *HindIII* Marker 3

FERMENTAS, St. Leon-Rot

Proteinstandards

Prestained Protein Marker Broad Range (6-175 kDa)

NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt

HMW Calibration Kit For Native Electrophoresis

AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg

2.8 Bakterienstämme, Kultur, Transformation und Kryokonservierung

***E.coli* DH5 α** (Klonierungsstamm)

Genotyp:

F⁻ 80d*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA*-argF) U169 *endA1 recA1 hsdR17*(r K -mK +) *deoR thi-1 supE44* I - *gyrA96 relA1*

***E.coli* BL21 (DE3)** (Expressionsstamm, T7-RNA-Polymerase)

Genotyp: F⁻ *ompT hsdS B* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* (DE3)

2.8.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien

LB-Medium: 1% NaCl, 1% Trypton, 0.5% Hefe-Extrakt, pH 7.5, autoklavieren

LB-Agar-Platten: LB + 1.5% Agar Selektionsmedium: LB (Agar) + 100mg/l Ampicillin

Ampicillin-Stammlösung: 100mg/ml Ampicillin in 50% Ethanol

Bakterien in Flüssigkulturen wurden aerob über Nacht bei 37°C (Brutraum) auf einem Schüttler (ca. 200rpm) inkubiert. Zur Anzucht von transformierten Kulturen (GVOs, meist Ampicillin-Resistenz) wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (c_{END} 100mg/l Ampicillin) zugesetzt. Für Plasmid-DNA-Minipräparationen wurde ein Volumen von 5ml LB (Amp) mit einer Bakterienkolonie bzw. für DNA-Midipräparationen ein Kulturvolumen von 100 bis 250ml mit 500 μ l einer Vorkultur beimpft. Zur Anlage von Bakterienglycerolstocks (Kryokonservierung) wurden 500 μ l Glycerol mit 750 μ l Bakterien-ÜNK steril in Kryoröhrchen gemischt und bei -80°C gelagert.

2.8.2 Erzeugung kompetenter Bakterien und Transformation

ϕ a-Medium: 0.5% Hefe-Extrakt, 2% Trypton, 40mM MgSO₄, mit KOH auf pH 7.6 einstellen; autoklavieren

TFBI Puffer: 30mM KOAc, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂, 15% Glycerol, mit 0.2M Essigsäure auf pH 5.8 einstellen, sterilfiltrieren

TFBII Puffer: 10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl, 15% Glycerol, mit KOH auf pH 6.5 einstellen, sterilfiltrieren

Bakterien der Stämme *E.coli* DH5 α (Klonierungsstamm) bzw. BL21 DE3 (Expressionsstamm)

wurden zunächst in einer Vorkultur mit ϕ a-Medium steril überimpft und ÜN im 37°C-Schüttler inkubiert. Nach einer 1:50-Verdünnung dieser Vorkultur in 100ml ϕ a-Medium erfolgte eine weitere Inkubation, bis eine $OD_{\lambda=595nm} = 0.5$ der Kultur erreicht war. Durch 10minütige Zentrifugation bei 3000rpm 4°C wurden die Bakterien pelletiert, anschließend in 40ml kaltem TFBII-Puffer resuspendiert und 5min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 4ml kaltem TFBII-Puffer resuspendiert und weitere 15min auf Eis inkubiert. Aliquots á 100 μ l dieser Zellsuspension wurden in vorgekühlte, sterile Reaktionsgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Transformation bei -70°C gelagert.

Nach dem Auftauen durch 10minütige Inkubation auf Eis wurde zu einem 100 μ l-Aliquot chemisch kompetenter *E.coli* DH5 α bei einer Klonierung der gesamte 20 μ l-Ligationsansatz (s. Kapitel 2.11.6.6) bzw. bei einer Retransformation ca. 50ng Plasmid-DNA zugegeben, vorsichtig gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90sec wurden die Zellen 2min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 900 μ l antibiotikafreiem LB-Medium versetzt. Einer einstündigen Inkubation unter Schütteln (1200rpm) bei 37°C zur Expression des plasmidcodierten resistenzvermittelnden Genes (z.B. β -Lactamase bei Ampicillinresistenz) folgte das Ausstreichen der Transformationsansätze (vorher bei 3000rpm 5min pelletiert) auf den Selektionsplatten (LB-Amp), welche ÜN bei 37°C zum Wachstum der transformierten Klone inkubiert wurden.

2.9 Hefestämme, Kultur, Transformation und konservierung

2.9.1 Kultur und Kryokonservierung von *S. cerevisiae*

***S. cerevisiae* Stamm HF7c:** Matchmaker Two-Hybrid Stamm, BD BIOSCIENCES / CLONTECH

Genotyp: MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, LYS2 : : GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA3 : : GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ

Vollmedium (YPD): 10g Hefe-Extrakt, 20g Trypton, ad 950ml H₂O, pH 6.5 einstellen, autoklavieren, anschließende Zugabe von 50ml steriler 40%Glucose-Lösung (C_{End} 20g/l)

Hefen wurden für Flüssigkulturen im entsprechenden Medium (HF7c in YPD-Vollmedium, Transformanten im entsprechenden Selektionsmedium) mdst. 3 Tage als 5ml Vorkultur bei 30°C unter Schütteln (250rpm) angezogen. Anschließend wurden die Hauptkulturen meist 1:200 beimpft. Das Wachstum auf Platten erfolgte ebenfalls bei 30°C für mdst. 5 Tage. Um ein Austrocknen der Platten zu verhindern, wurden sie stets mit Parafilm umschlossen und kopfüber inkubiert. Die Kryokonservierung von Hefen erfolgte ebenfalls in Glycerolstocks (750 μ l Hefesuspension + 500 μ l steriles Glycerol) bei -70°C.

Synthetisches Selektionsmedium (Complete minimal): 1.7g Yeast Nitrogen Base – AA/AS, 5g (NH₄)₂SO₄, 100ml entsprechende *Dropout-Solution* (s.u.), ad 950ml H₂O, pH 5.8 einstellen, autoklavieren, anschließende Zugabe von 50ml steriler 40% Glucose-Lösung (C_{End} 20g/l)

Platten: YPD bzw. SD-Medium mit 2% Agar

10x DROPOUT Solutions: Zusammensetzung laut CLONTECH: je 200mg/l Adenin, Arginin, Histidin, Methionin, Tryptophan, Uracil; je 300mg/l Isoleucin, Lysin, Tyrosin; 500mg/l Phenylalanin, 1000mg/l Leucin, 1500mg/l Valin und 2000mg/l Threonin

- | | |
|---|---|
| - LEU (essentielle AS ohne Leu): | Kultur von pACT2_Transformanten |
| - TRP (essentielle AS ohne Trp): | Kultur von pAS2-1_Transformanten |
| - LEU -HIS (essentielle AS ohne Leu, His): | Test auf Transtaktivierung pACT2_Transformanten |
| - TRP-HIS (essentielle AS ohne Trp, His): | Test auf Transaktivierung pAS2-1_Transformanten |
| - LEU-TRP (essentielle AS ohne Leu, Trp): | Kultur von pACT2 / pAS2-1_Doppeltransformanten |
| - LEU-TRP-HIS (essentielle AS ohne Leu, Trp, His) : | Test auf Proteininteraktion |

2.9.2 Erzeugung kompetenter Hefen und Transformation

10x TE : 0.1M Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 7.5, autoklavieren

10x LiAc : 1M Lithiumacetat (SIGMA), pH 7.5 mit Essigsäure einstellen, autoklavieren

50% PEG: Polyethylenglycol ca. MW 3350 (SIGMA) mit sterilem, deionisierten H₂O vermischt und autoklaviert

PEG/LiAc: 8ml 50%PEG, 1ml 10x TE, 1ml 10x LiAc

Hering-Sperma-DNA: 10mg/ml *herring testes carrier DNA* (BD BIOSCIENCES / CLONTECH)

Für eine effiziente Transformation sollten kompetente Hefezellen nicht gelagert, sondern jeweils frisch erzeugt werden. Kompetente Hefen wurden nach dem Protokoll „*Small-scale LiAc Yeast Transformation Procedure*“ (CLONTECH Yeast Protocols Handbook: <http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/manuals/PDF/PT3024-1.pdf>) hergestellt. Dafür wurde eine 50ml Flüssigkultur im entsprechenden Medium bei 30°C unter Schütteln (250rpm) ca. 16-18h bis zum Erreichen der stationären Phase ($OD_{\lambda=600nm} > 1.5$) angezogen. 30ml dieser ÜNK wurden auf 300ml Medium überimpft (OD_{600nm} ca. 0.2 bis 0.3) und für ca. 3 weitere Stunden bei 30°C unter Schütteln (250rpm) inkubiert, bis eine OD_{600nm} von ca. 0.4 bis 0.6 erreicht wurde. Durch 5minütige Zentrifugation bei 1000 x g und R9 wurden die Hefen pelletiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in insgesamt 50ml sterilem 1x TE aufgenommen, erneut zentrifugiert (s.o.) und abschließend in 1.5ml 1x TE / 1x LiAc resuspendiert. Jeweils 100µl dieser kompetenten Hefen wurden mit 0.1µg der entsprechenden Plasmid-DNA des Transformationsansatzes, zuvor vermischt mit 0.1mg Hering-Sperma-DNA, versetzt und die Suspension gemischt (vortex). Nach der Zugabe von 0.6ml PEG/LiAc-Lösung wurde ebenfalls für mdst. 10sec gründlich gevortext. Nach einer Inkubation bei 30°C im Schüttler (200rpm, 30min) wurden die Zellen mit 70µl DMSO versetzt und vorsichtig vermischt (kein Vortexen). Einem 15minütigen Hitzeschock bei 42°C folgte eine Abkühlung auf Eis und eine Zentrifugation (5sec 14 000 rpm bei R9). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 0.5ml sterilem 1x TE aufgenommen und auf Selektionsplatten (s.o.) ausplattiert, die mehrere Tage, verschlossen mit Parafilm, bei 30°C inkubiert wurden.

2.10 Humane Zelllinien, Kultur, Transfektion und Kryokonservierung

Kulturbedien: BASAL ISCOVE's Medium; RPMI 1640 Medium (BIOCHROM, Berlin), Supplemente (BIOCHROM Berlin): 100U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin und 10 bis 20% FCS

2x Freezing-Mix: 50% FCS, 20% DMSO in nicht supplementiertem Medium

10x PBS: 80g NaCl, 2g KCl, 14.4g Na₂HPO₄*2H₂O, 2g KH₂PO₄ ad 1l H₂O, pH 6.63 mit HCl einstellen, autoklavieren

Stammlösung zur Neomycin-Selektion: 100mg/ml Geneticin in 1M HEPES pH 7.0

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien humanen Ursprungs wurden entsprechend ihres Wachstums in Zellkulturschalen (adhärent) bzw. -flaschen (Suspensionszellen) bei 37°C, einer Atmosphäre mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in Begasungsbrutschränken (HERAEUS, Hanau) kultiviert. Zur Anzucht großer Mengen Suspensionszellen für Proteasom- bzw. Precursor-Aufreinigungen fanden sog. Spinnerflaschen (BELLCO / DUNN Labortechnik, Asbach) Anwendung mit Magnetrührsystem und einem Kulturvolumen bis zu 3l, die auf einem Magnetrührer (IKAMAG RCT, FISHER SCIENTIFIC, Schwerte) im Brutschrank inkubiert wurden. Sämtliche Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen in einer Laminarbox [SteriGARD Hood, LABOTECT, Göttingen] statt. Die verwendeten Zelllinien und die entsprechenden Vollmedien sind in Tabelle 8 aufgeführt. Stabile Transfektanten (Tabelle 9) wurden in Vollmedium unter Zusatz von 1mg/ml Geneticin (G418) zur dauerhaften Neomycin-Selektion kultiviert.

Tabelle 8: Humane Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, und ihre Wachstumsbedingungen.

Zelllinie	Zelltyp	Kulturbedien	Wachstum
HEK293	embryonale Nierenzellen	Basal Iscove's / 20% FCS	adhärent
Caco-2	Colonadenocarcinom	RPMI / 20% FCS	adhärent
Colo205	Ascites-Metastase eines Colonadenocarcinoms	RPMI / 10% FCS	adhärent / Suspension
DLD-1	Colonadenocarcinom	RPMI / 10% FCS	adhärent
HCT 116	Coloncarcinom	Basal Iscove's / 10% FCS	adhärent
HeLa	Zervixepithelcarcinom	RPMI o. Basal Iscove / 10% FCS	adhärent
HeLa S3	Zervixepithelcarcinom	RPMI / 10% FCS	Suspension
HT 29	Colonadenocarcinom	Basal Iscove's / 10% FCS	adhärent
Rko	Coloncarcinom	RPMI / 10% FCS	adhärent
SW-480	Colonadenocarcinom	Basal Iscove's / 10%FCS	adhärent
T2	Derivat der Lymphoblastoidlinie .174	RPMI / 10% FCS	Suspension

Zum Passagieren von konfluenten Zellen wurden die Zellen zunächst mit sterilem 1xPBS gewaschen und anschließend unter der Einwirkung von Trypsin/EDTA-Lösung (GIBCO / INVITROGEN) abgelöst. In einem sich anschließenden Waschschrift mit Vollmedium und einer Zentrifugation bei 4°C 1200rpm 5min wurden sowohl das bei längerer Einwirkung zellschädigende Trypsin als auch abgestorbene Zellen und Zelltrümmer aus der Suspension entfernt. Nach dem Resuspendieren des Zellpellets im entsprechenden Vollmedium wurden die Zellen entweder für eine weitere Kultivierung in einem adäquaten Verhältnis gesplittet (1:2 bis 1:25) oder, für sich anschließende Experimente für die eine exakte Zellzahlbestimmung nötig war, mittels Trypanblau-Färbung (SIGMA) in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Das Splitten von Suspensionszellen erfolgte durch teilweises Absaugen der Zellsuspension und adäquates Verdünnen mit frischem Vollmedium. Zur Induktion u.a. der Immunoproteasom-Biogenese durch IFN γ wurden die Zellen einen Tag nach dem Passagieren durch Zugabe von standardmäßig 150U/ml humanem IFN γ (rekombinant, ROCHE) im allgemeinen über 24 Stunden stimuliert.

Tabelle 9: Stabile Transfektanten humaner Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet bzw. generiert wurden und ihre Eigenschaften.

Name	Zelllinie / transfiziert mit	Kulturmedium	Herkunft bzw. Beschreibung
T2 2/7	T2 / LMP2 und LMP7	RPMI / 10% FCS + G418	(Kuckelkorn, et al., 1995; Schmidt, et al., 1999)
T2 LMP2	T2 / LMP2	RPMI / 10% FCS + G418	(Kuckelkorn, et al., 1995; Schmidt, et al., 1999)
T2 LMP7	T2 / LMP7	RPMI / 10% FCS + G418	(Kuckelkorn, et al., 1995; Schmidt, et al., 1999)
T2 Δ proLMP7	T2 / Prosequenz-deletiertes LMP7	RPMI / 10% FCS + G418	(Witt, et al., 2000)
T2 LMP7 T1A	T2 / LMP7 T1A (Funktionsverlust-mutante LMP7)	RPMI / 10% FCS + G418	(Sijts, et al., 2000; Witt, et al., 2000)
RKO_LMP7	Rko + LMP7 (LMP7_E2Q)	RPMI / 10% FCS + G418	S. Heink

Zur Konservierung wurden Zellen einer zu 70 bis 80% konfluent bewachsenen Kulturschale bzw. -flasche zunächst geerntet, mit PBS gewaschen und zentrifugiert sowie die Lebendzellzahl mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Anschließend wurde das Zellpellet in 1VT Kulturmedium resuspendiert, in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert (je ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen) und mit je 1VT 2x *Freezing*-Mix vermischt. Die Röhrchen wurden in einer Isopropanol-gefüllten Kryobox (QUALILAB) bei -80°C ÜN eingefroren und dann zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff transferiert. Zum Anlegen einer neuen Kultur geringer Passage-Anzahl wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen im 37°C Wasserbad aufgetaut. Durch zwei Waschschriffe (Aufnahme in je 10ml vorgewärmtem Vollmedium und Pelletieren bei 4°C 1200rpm 5min) wurde das zellschädigende DMSO des Einfriermediums entfernt.

Anschließend wurden die Zellen in einem adäquaten Volumen Vollmedium resuspendiert und in das Kulturgefäß überführt

2.10.1 Metabolische ^{35}S -Markierung (*Pulse-Chase*)

Lysepuffer: 1xPBS mit 0.5% NP-40

MG-132 Stammlösung: 10mM MG-132 in DMSO

Für *Pulse Chase*-Experiment wurden die Zellen zunächst in 6well- oder 6cm-Schalen ausgesät und z.T. (wie angegeben) mit 150U/ml IFN γ über 24h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen und 1h in supplementiertem (1% dialysiertes FCS und 1% L-Glutamin) Methionin-freiem RPMI-Medium (BIOCHROM, Berlin) inkubiert. Pro 6well wurden je ca. 200 μCi , je 6cm-Schale ca. 300 μCi ^{35}S -Methionin / ^{35}S -Cystein (TRAN ^{35}S -Label, ICN) in das 'Hunger'medium gegeben und die Zellen für 1h (HeLa, T2) bzw. 3h zur *in vivo* Markierung inkubiert (*Pulse*). Für sog. Langzeit-*Pulse Chase*-Experimente mit sehr langen *Chase*-Zeiten zur Bestimmung der Halbwertszeit von Proteasomen wurden die Zellen über 8h markiert (*Pulse*), um eine ausreichende Markierung zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen intensiv (mdst. dreimal mit 1xPBS) gewaschen. Nach Zugabe von supplementiertem Vollmedium wurden die Zellen für die unterschiedlichen Zeiträume (wie angegeben) weiter inkubiert (*Chase*). Zum entsprechenden *Chase*-Zeitpunkt wurden Suspensionszellen durch Zentrifugation pelletiert und mit 1xPBS gewaschen. Adhärent wachsende Zellen wurden ebenfalls mit 1xPBS gewaschen und anschließend direkt auf der Platte durch Zugabe von je 500 μl Lysepuffer lysiert. Sowohl Suspensions- als auch adhärenente Zellen wurden durch 5minütige Inkubation auf Eis lysiert. Durch anschließende Zentrifugation (1min 14 000 rpm) wurden die Zelltrümmer pelletiert und der lösliche Protein-Überstand gewonnen, dieser wurde durch Zugabe (laut Herstellerangaben) von *Complete* (Protease-Inhibitoren Cocktail) stabilisiert. Um eine womöglich fortschreitende Maturierung von proteasomalen Precursorkomplexen zu unterdrücken, wurde dem Lysat ebenfalls der Proteasom-Inhibitor MG-132 mit einer Endkonzentration von 10 μM zugesetzt. Anschließend wurden die Proben zur Immunpräzipitation eingesetzt (s. 2.12.2.3).

2.10.2 Transfektion humaner Zellen

2.10.2.1 TRANSIENTE TRANSFEKTION

Fixans: 2% Formaldehyd, 0.2% Glutaraldehyd in PBS

X-Gal-Färbelösung: 0.2% X-Gal (aus 2%iger Stocklösung in DMF), 2mM MgCl $_2$, in PBS

Die Transfektion humaner Zellen (z.B. HeLa) erfolgte durch Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz FuGENE 6 (ROCHE) laut Herstellerangaben. Da die humane Coloncarcinom-Zelllinie Rko nicht mittels FuGENE 6 transfiziert werden kann, wurde diese mit dem Transfektionsreagenz LipofectAMINE 2000 (INVITROGEN), basierend auf kationischen Lipiden, transfiziert. Aufgrund der schlechten Transfektionseffizienz von Rko-Zellen wurde das standardisierte Herstellerprotokoll variiert und verschiedene Abwandlungen (Konfluenz der

Zellen, DNA- und LipofectAMINE 2000-Verhältnisse und Mengen etc.) getestet. Diese methodischen Variationen wurden auf ihre Effizienz mittels der Test-Transfektion mit einem Expressionsvektor codierend für β -Galactosidase (β -Gal / pcDNA3) als Reporter durchgeführt. Nach der Transfektion wurden die Zellen zur β -Gal-Expression 24 bis 48h im Vollmedium inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 3ml Fixans in der 6cm-Schale fixiert (Inkubation 15min bei R9). Nach der Entfernung des Fixativs wurden die fixierten Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen, mit je 1ml X-Gal-Färbelösung versetzt und ca. 3h bei R9 auf einem Schüttler inkubiert. Am effizientesten konnten Rko-Zellen mit den Expressionsplasmiden für β -Gal bzw. für LMP7 (s. Tabelle 6) transfiziert werden nach dem Protokoll '*Transfection Protocol RKO Cells With LIPOFECTAMINE™ 2000 Reagent*' (Dr. D.Biard, <http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=4210&cfid=1955043&cftoken=80857567>).

Auch das eigentliche Zielprotein LMP7 (β 5i) wurde nach einer Kulturdauer von 24 bis 48h im Anschluss an die Transfektion stark exprimiert, wie Immunoblots zeigten (vgl. auch Kapitel 2.10.3.2). Sollte in den LMP7-exprimierenden Rko-Transfektanten eine Immunoproteasom-Formation induziert werden, wurden die Zellen 4h nach der transienten Transfektion mit 150 U/ml IFN γ stimuliert und nach weiteren 20h geerntet.

2.10.3 Stabile Transfektion und Screening

Stammlösung zu Neomycin-Selektion: 100mg/ml Geneticin in 1M HEPES pH 7.0

Nach der LipofectAMINE 2000-basierten Transfektion von Rko-Zellen mit LMP7_E2 $_Q$ _TOPO (pcDNA3.1D, s. Tabelle 6) wurden die Zellen vereinzelt (96wells) und der Neomycin-Selektion durch die Zugabe von Geneticin (G418) unterzogen. Nach der klonalen Expansion (mdst. 2 Wochen) wurden die Klone in größere Kulturgefäße durch Ablösen mit Ca $^{2+}$ /Mg $^{2+}$ -freiem Medium überführt. Das *Screening* der einzelnen Klone erfolgte sowohl durch Nachweis der transfizierten DNA (s. Kapitel 2.10.3.1) als auch per Nachweis des exprimierten Proteins (s. Kapitel 2.10.3.2).

2.10.3.1 SCREENING MITTELS PCR

Lysepuffer: 1 x PCR Puffer, 50 μ g/ml Proteinase K, 0.5 % Tween 20, 0.5 % NP-40

Die Zellen einer 24well-Kavität wurden geerntet, pelletiert und in je 30 μ l Lysepuffer aufgenommen. Nach einer Inkubation 1h bei 56°C wurde die Proteinase K durch 10minütiges Kochen denaturiert, die Zelltrümmer abzentrifugiert (14.000rpm 10min) und je 7.5 μ l des Überstandes in einer PCR mit Primern, spezifisch für die transfizierte LMP7-DNA, eingesetzt.

2.10.3.2 SCREENING MITTELS IMMUNOBLOT

Das Screening der Rko_LMP7-Transfektanten erfolgte nach einem Aufschluß der Zellen (s. Kapitel 2.12.2.1) mittels Standard-Western Blot (2.12.3.3) mit Antikörpern spezifisch gegen das (bei Rko-Transfektanten) neu exprimierte β 5i-Protein LMP7.

2.11 Molekularbiologische Arbeiten

2.11.1 Isolation von RNA und DNA aus humanen Zellen

Die Gesamt-RNA – Isolierung aus humanen Kulturzellen erfolgte mittels *High Pure RNA Isolation Kit* gemäß Herstellerangaben. Die RNA-Ausbeute wurde durch optische Messung bei $\lambda=260$ nm bestimmt und die Qualität der Aufreinigung aus dem Verhältnis von $OD_{\lambda=260nm}$ zu $OD_{\lambda=280nm}$ abgeschätzt. Die Präparation von genomischer DNA aus humanen Zellen erfolgte gemäß Herstellerprotokoll zum *High Pure PCR Template Preparation Kit*.

2.11.2 Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden

Die RNA-Markierung mit Digoxigenin beruhte auf der *in vitro* Transkription mittels T7 RNA Polymerase und *DIG RNA Labeling Mix*. Zur RNA-Sondenherstellung benötigt somit die Zielsequenz an ihrem 3' Ende einen T7 Promotor, der in *antisense* Orientierung liegt. Nach Bindung der T7 RNA Polymerase an den Promotor, synthetisiert sie die *antisense*-RNA-Sonde und baut die angebotenen, mit Digoxigenin markierten Uracil-Nucleotide ein. Als Matrize wurden entweder eine linearisierte, Plasmid-codierte Zielsequenz verwendet, die in das entsprechenden Plasmid vor einen T7 Promotor kloniert wurde, oder die Zielsequenz wurde mittels Standard-PCR amplifiziert. Einer der PCR – Primer enthält dann, neben dem hybridisierenden Bereich, die Sequenz des T7 Promotors (s. Tabelle 2). Die Markierungsreaktion wurde nach Herstellerangaben ausgeführt. Um die nach der Transkription noch vorhandene DNA zu entfernen, wurde der Ansatz mit 2µl DNase (Kit) versetzt und für 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte unter Zugabe von 1µl 0.5 M EDTA (pH 8.0). Dem Ansatz wurden 2,5µl 4M LiCl und 75µl absolutes Ethanol zugesetzt und die RNA bei – 20°C (ÜN) oder – 70°C (1h) gefällt. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4° C wurde die pelletierte RNA mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter 10minütiger Zentrifugation und Trocknen des Pellets im Vakuum wurde es in 100µl DEPC-H₂O (s. Kapitel 2.11.3), versetzt mit 1µl RNase-Inhibitor *RNasin*, aufgenommen und gelöst (Lagerung bei –70°C). Die Überprüfung der effizienten Markierung und die Ermittlung der adäquaten Verdünnung der RNA-Sonden erfolgte im *Dot Blot*-Verfahren. Dafür wurde einer Verdünnungsreihe der Sonde (1:100 bis 1:100.000) in Hybridisierungslösung (s. Kapitel 2.11.3) hergestellt und je 1µl der Sondenverdünnungen auf eine Nylonmembran aufgetropft. Die Sondenverdünnung kann mehrfach verwendet werden und wird bei – 20° C aufbewahrt. Die Membran wurde 3min auf einem UV-Tisch inkubiert, um die RNA auf der Membran zu fixieren. Die Detektion (Blockierung, Antikörper-Inkubation etc.) erfolgte wie in Kapitel 2.11.3 beschrieben.

2.11.3 Northern Blot

DEPC-H₂O: 0.1% DEPC v/v: Zugabe von 1ml DEPC zu 1l entsalztem aqua dest, Inkubation ÜN bei 37°C, autoklavieren

10xMOPS Puffer: 0.2M MOPS, 50mM Natrium-Acetat, 10mM EDTA, pH 7.0, sterilfiltrieren in sterile 'Falcon'-

Röhrchen (Lagerung -20°C)

1x Laufpuffer: 10xMOPS in DEPC-H₂O verdünnen

denaturierendes Agarosegel: 1.5% Agarose in Laufpuffer mit 220mM Formaldehyd (Agarose z.B. in 73ml DEPC-H₂O und 10ml 10xMOPS aufkochen und auf ca. 60°C abkühlen lassen, Zugabe von 17ml 37% Formaldehyd, mischen und in H₂O₂-vorbehandelte Kammer giessen)

5x RNA-Probenpuffer: 16µl gesättigte Bromphenolblaulösung, 80µl 0.5 M EDTA pH 8.0, 100µl Ethidiumbromid (10 mg/ml), 720µl 37% Formaldehyd, 2ml 100% Glycerol, 3084µl Formamid, 4ml 10x MOPS Puffer, ad 10ml DEPC-H₂O, -70° C lagern

Denaturierungslösung: 50mM NaOH, 10mM NaCl in DEPC-H₂O, autoklavieren

Neutralisierungslösung: 0.1M Tris HCl pH 7.4 in DEPC-H₂O, autoklavieren

20x SSC: 3M NaCl, 0.3M Natriumcitrat, pH 7.0 in DEPC-H₂O, autoklavieren

Hybridisierungslösung: 5x SSC, 7% SDS, 0.1% N-Laurylsarcosin (SIGMA), 1% Puffer 2, autoklavieren und anschließend Zugabe von 50% Formamid

Puffer 1: 0.1M Maleinsäure pH 7.5, 150mM NaCl, autoklavieren

Blockingreagent-Stammlösung: 10% *Blocking Reagent for nucleic acid hybridization / detection* in Puffer 1

Puffer 2: 1/10 VT *Blockingreagent-Stammlösung* in Puffer 1 (result.:1%)

Puffer 3: 100mM TrisHCl pH 9.5, 100mM NaCl

Waschpuffer A : 2x SSC, 0.1% SDS, in DEPC-H₂O Waschpuffer B : 0.2x SSC, 0.1% SDS, in DEPC-H₂O

Zunächst wurde das unbeladene denaturierende Agarosegel einem 10minütigen 'Elektrophorese-Vorlauf' bei 120V in 1x Laufpuffer unterzogen. Einheitlich ca. 3 bis 5µg RNA wurden in RNA-Probenpuffer aufgenommen und 10 Minuten bei 65° C denaturiert. Nach dem Auftrag der Proben bzw. des Längenstandards (s. Kapitel 2.7) wurde die RNA elektrophoretisch aufgetrennt (ca. 1 bis 2h bei 120V), dabei wurde der Laufpuffer mit Magnetrührern umgewälzt. Um den Auftrag gleicher Gesamt-RNA-Mengen anhand vergleichbarer Intensitäten ribosomaler 18S- und 28S-RNA zu dokumentieren, wurde das Gel mittels einer Gel-Dokumentationseinheit auf einem UV-Tisch photographiert. In eine Vakuum-Blotting-Apparatur wurde auf eine poröse Trägerplatte die in DEPC-H₂O angefeuchtete Nylonmembran und darüber eine Folien-Maske (Ausschnitt um wenige mm kleiner als die Abmaße des Gels) geschichtet. Darauf wurde das Gel gelegt und dieses nach dem Anlegen des Vakuums (55mbar, VacuGene Pumpe, AMERSHAM) mit Denaturierungslösung zur partiellen RNA-Hydrolyse überschichtet. Nach 10min wurde diese entfernt und durch Neutralisierungslösung ersetzt (5min). Der Transfer erfolgte für 1 bis 2h unter ständiger Überschichtung des Gels mit 20x SSC-Lösung. Anschließend wurde die Membran kurz in 20x SSC-Lösung geschwenkt, um mögliche Agarosereste zu entfernen, und zur Fixierung der RNA 3min kopfüber auf einem UV-Tisch inkubiert (*cross-linking*). Der erfolgreiche Transfer wurde durch Photographieren der Membran dokumentiert, wobei erneut die ribosomale RNA visualisiert wurde. Anschließend wurde die Membran in autoklavierte, mit Hybridisierungslösung gefüllte Hybridisierungsröhren überführt und diese rotierend im Inkubator bei 68°C für 1h inkubiert.

Die Hybridisierung mit verdünnter DIG-markierter RNA-Sonde (meist 1:1000, s. Kapitel 2.11.2)

erfolgte ÜN bei 68°C im Hybridisierungsinubator. Zur Detektion wurde die Membran bei 68°C zweimal je 5min in Waschpuffer A und zweimal je 15min in Waschpuffer B rotierend gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Puffer 1 äquiliert und in Puffer 2 mindestens 30min bei R9 blockiert. Der Digoxigenin-spezifische Antikörper (s. Kapitel 2.6.4), gekoppelt an AP (alkalische Phosphatase) wurde 1:10.000 in Puffer 2 verdünnt und die Membran darin 30min bei R9 inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal 15min in Puffer 1 gewaschen und in Puffer 3 geschwenkt. Als AP-Substrat diente das sensitive Chemilumineszenz-Substrat *CDP-Star, ready-to-use*. Nach 5minütiger Inkubation der Membran in der Substratlösung, wurden die Signale durch Exposition (bis 30min) von *X-OMAT UV Scientific Imaging* Filmen (KODAK) detektiert.

2.11.4 cDNA-Herstellung (Reverse Transkription)

Prä-Mix: 2µg RNA + 1µl Oligo(dT)-Primer (50 µM) ad 17µl DEPC-H₂O

Reaktionsmix: 1µl M-MuLV Reverse Transkriptase, 5µl zugehöriger *First Strand Buffer* (5x), 1µl RNase Inhibitor (*RNasin*), 1µl 25mM dNTP-Mix

Zur cDNA-Gewinnung wurden 2µg Gesamt-RNA (s. Kapitel 2.11.1) durch die 'USB' M-MuLV Reverse Transkriptase (*Moloney Murine Leukemia Virus* RT) und oligo(dT)-Primer zur Umschreibung aller mRNA-Spezies revers transkribiert. Seltener erfolgte eine spezifische reverse Transkription nur einer bestimmten mRNA-Spezies mit spezifischen *reverse* Primern (s. Tabelle 2). Zunächst erfolgte eine 10minütige Denaturierung der mRNA bei 65°C und eine 2minütige Hybridisierung der Oligonucleotide an die mRNA bei 4°C durch Inkubation des Prä-Mixes im PCR-Thermocycler. Anschließend wurde der Reaktionsmix zugegeben, die Umschreibung bei 42°C für 1h durchgeführt und abschließend die Reverse Transkriptase 2min bei 95°C denaturiert.

2.11.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Ansatz: 2µl cDNA bzw. 50ng Plasmid-DNA, 0,5 bis 1µl DNA-Polymerase (s.u.), 5µl 10x Puffer, 1µl dNTP-Mix 10mM each, je 0,5µl 50µM *forward* (5') und *reverse* (3') Primer (s. Tabelle 2), ad 50µl H₂O

Zur DNA-Analyse erfolgte die Amplifizierung mit *Taq* DNA-Polymerase. Sollte sie jedoch kloniert werden, wurde mit dem *Expand High Fidelity* PCR System amplifiziert, das eine 'Korrektur-lesende' Aktivität (*proof reading*) besitzt. Der 50µl PCR-Ansatz (s.o.) wurde in einem PCR-Thermoblock mit Deckelheizung inkubiert, so dass keine Mineralöl-Überschichtung nötig war. Das Standard-PCR-Protokoll (s.u.) wurde nur für lange Amplifikate (längere Elongation) oder Primerkombinationen mit anderen Hybridisierungstemperaturen (*Annealing*) verändert. Die *Annealing*-Temperatur wurde über die „4+2-Faustregel“ abgeschätzt [$(\sum A/T_{\text{hybrid.}}) * 2^{\circ}\text{C} + (\sum G/C_{\text{hybrid.}}) * 4^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C} = \text{Annealing-}\theta$; (Muelhardt, 1999)]. Bei semi-quantitativen RT-PCR-Analysen zur Untersuchung von differentiellen Expressionsniveaus einer bestimmten mRNA wurde die Anzahl der Amplifizierungszyklen verringert (20 bis 25 Zyklen), um zu verhindern, dass die Plateauphase der Reaktion erreicht wird.

Anzahl der Zyklen	Segment	Temperatur [°C]	Dauer
1	Prä-Denaturierung	94	5min
30	Denaturierung	94	30sec – 1min
	Annealing	55 (variabel)	30sec – 1min
	Elongation	72	30sec /500bp Amplifikatgröße
1	End-Elongation	72	10min

2.11.6 Analyse und Klonierung von DNA

2.11.6.1 RESTRIKTION VON DNA

Sowohl ringförmige Plasmid-DNA als auch PCR-Fragmente wurden analytisch bzw. präparativ mit Restriktionsendonucleasen verdaut. Zur Restriktionshydrolyse von bis zu 5µg Plasmid-DNA wurden 2 bis 10U der entsprechenden Restriktionsendonuclease (NEB) unter Zugabe des zugehörigen 10x Puffers in einem Ansatzvolumen von 20µl eingesetzt und der Restriktionsansatz meist bei 37°C (entsprechend des Enzyms) für 2 bis 4h inkubiert. Sollte ein simultaner 'Doppelverdau' mit zwei Enzymen durchgeführt werden, wurde der entsprechende Puffer laut Tabelle 'Suggested NEBuffs for Double Digestion' ausgewählt. Erforderten zwei Enzyme einen sequentiellen Verdau, wurde dazwischen die DNA laut Protokoll 'Purification of DNA from solution' aufgereinigt (GFX - PCR DNA and Gel Band Purification Kit). Eine Klonierung (s. Kapitel 2.11.6.6) von PCR-Fragmenten erfordert eine PCR-Amplifizierung mit sog. Ankerprimern (inklusive Schnittstellen für Restriktionsenzyme, s. Tabelle 2). Nach der PCR wurden die DNA-Fragmente zunächst aus dem PCR-Ansatz laut Protokoll 'Purification of DNA from solution' aufgereinigt (GFX - PCR DNA and Gel Band Purification Kit). Das GFX-Elutionsvolumen von 50µl erforderte eine Erhöhung des Volumens des Restriktionsansatzes auf 60µl. Nach einem präparativen Restriktionsverdau wurden die Enzyme entweder bei 65°C für 15min inaktiviert (laut Herstellerangaben) oder die DNA aus dem Restriktionsansatz erneut mittels GFX-Kit aufgereinigt.

2.11.6.2 FILL IN REACTION

Fill In-Ansatz: bis zu 1.5µg DNA, 1U Klenow, 2µl 10x Puffer, 1µl dNTP-Mix 10mM each, ad 20µl H₂O

Um PCR-Fragmente z.B. in die Plasmide pIVEX2.3 (s. Tabelle 3) bzw. pAS2-1 (s. Tabelle 5) zu klonieren, machte sich eine einseitige (3'-Seite) *Blunt end*-Klonierung erforderlich. Die 5' Klonierungsstelle lag durch Restriktion mit Enzymen, die Überhänge erzeugen, als *sticky end* vor. Da die MCS der Plasmide keine geeigneten Erkennungssequenzen für *Blunt end*-Restriktionsenzyme aufwiesen, wurde zunächst auf der 3'Klonierungsstelle ein 5'-Überhang erzeugt, der jedoch in einer sich anschließenden Behandlung der DNA mit DNA Polymerase I,

Large (Klenow)-Fragment aufgefüllt wurde (*Fill In*-Reaktion). Danach erfolgte die Restriktion mit dem zweiten Enzym, das kompatible Einzelstrangenden (*sticky ends*) erzeugte. Auch das PCR-Produkt wurde vor der Restriktion einer Klenow-Behandlung unterzogen, um sicher zu gehen, dass dieses ebenfalls ein 'glattes' 3'-Ende aufwies. Die *Fill In*-Reaktion erfolgte in einem 20µl-Ansatz (s.o.) durch 20minütige Inkubation bei R9. Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.5µl 0.5M EDTA pH 8.0 gestoppt.

2.11.6.3 DEPHOSPHORYLIERUNG VON KOMPATIBLEN DNA-ENDEN

Zur Vorbereitung einer Ligation (s. Kapitel 2.11.6.6) wurde der jeweilige Vektor mit den der Klonierungsstrategie entsprechenden Restriktionsendonucleasen verdaut (s. Kapitel 2.11.6.1). Um eine Religation des Plasmids (vor allem bei *Blunt end*-Klonierungen, s. Kapitel 2.11.6.2, oder bei der ungerichteten Klonierung mit nur einem Enzym) zu unterdrücken, müssen die 5' Enden des Vektors dephosphoryliert werden. Die *Shrimp* alkalische Phosphatase (SAP, ROCHE) hydrolysiert das 5' Phosphat an den Enden linearisierte Plasmide. Je 2U SAP (pro 50ng DNA) wurde gemäß Herstellerangaben zur linearisierten Vektor-DNA im entsprechenden SAP-Puffersystem hinzugegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde das Enzym 15min bei 65°C inaktiviert.

2.11.6.4 ANALYTISCHE UND PRÄPARATIVE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

10x DNA-Probenpuffer: 50% Glycerol, 50mM EDTA pH 8.0, 0.1% Bromphenol-Blau, 0.1% Xylencyanol

25x TAE: 1M Tris, 0.475M Essigsäure, 25mM EDTA, autoklavieren

Ethidiumbromid-Stocklösung: 10mg/ml in H₂O

Zur Kontrolle der Konzentration, Reinheit oder Größe von DNA-Fragmenten bzw. zu deren präparativer Auftrennung wurde die Probe mit 10x DNA-Probenpuffer versetzt und einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen. Dabei wurde die entsprechende Menge Agarose (1 bis 1.5%) in 1xTAE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung Ethidiumbromid in einer Konzentration 0.6µg/ml Agaroselösung zugesetzt und das Gel im Schlitten der Gelapparatur mit eingesetztem Probenfächerkamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels, dem Auffüllen der Gelapparatur mit 1xTAE-Puffer sowie dem Auftragen der Proben bzw. des Längenstandards (s. Kapitel 2.7) wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt (konstant 100V). Aufgrund des DNA-interkalierenden Ethidiumbromids und dessen Fluoreszenz konnten unter UV-Licht die DNA-Fragmente sichtbar und das Gel photographisch dokumentiert werden. Schloss sich für eine spätere Klonierung eine Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel an, erfolgte die Bandendetektion und -exzision (Skalpell) bei nur 70% UV-Strahlungsintensität des Transilluminators.

2.11.6.5 GELELUTION VON DNA-FRAGMENTEN

Die Elution von DNA aus Agarosegel-Fragmenten erfolgte mittels GFX - *PCR DNA and Gel Band Purification Kit* laut Protokoll '*Purification of DNA from gel bands*', wobei die DNA mit 50µl autoklaviertem, destilliertem H₂O vom Säulenmaterial eluiert wurde.

2.11.6.6 LIGATION

Ligationsansatz: 1U T4 DNA-Ligase, 2µl 10x Ligasepuffer, ca. 50ng Plasmid-DNA, ca. 150ng Insert-DNA, ad 20µl H₂O

Nach der Restriktion der zu ligierenden DNA (s. Kapitel 2.11.6.1) und der Dephosphorylierung der 5'Enden des Plasmids (s. Kapitel 2.11.6.3) wurden Insertfragment (ca. im Verhältnis 3:1 zur Vektor-DNA-Menge) und linearisierter Vektor vermischt. Der Ligationsansatz (s.o.) wurde bei 16°C ÜN inkubiert und anschließend komplett in einer Transformation eingesetzt (s. Kapitel 2.8.2).

2.11.6.7 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA

Die Konzentration von DNA-Präparationen wurde photometrisch durch Messung der Extinktion der Probe in Quarzküvetten bei den Wellenlängen $\lambda=260\text{nm}$ bzw $\lambda=280\text{nm}$ bestimmt (Photometer *UltrospecIII*). Dabei stützte sich die Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA auf die Berechnung $c_{\text{DNA}} [\mu\text{g/ml}] = 50 \cdot \text{OD}_{\lambda=260\text{nm}}$. Um die Reinheit einer DNA-Präparation zu kontrollieren, wurde der Quotient aus den Extinktionen bei beiden Wellenlängen gebildet ($\text{OD}_{\lambda=260\text{nm}} / \text{OD}_{\lambda=280\text{nm}}$), wobei reine DNA-Präparationen einen Quotienten zwischen 1.7 und 2.0 aufweisen sollten.

2.11.6.8 DNA-SEQUENZIERUNG

Zur Kontrolle sämtlicher Klonierungen bzw. zur genomischen Analyse des *PSMB8*-Locus verschiedener humaner Zellen wurden die DNA-Proben zur Sequenzierung an den Sequenzierservice der AGOWA GmbH, Berlin, geschickt. Dort wurden sowohl klonierte DNA als auch PCR-Fragmente sequenziert.

2.11.7 **Plasmidisolation aus *E. coli***

2.11.7.1 'QUICK & DIRTY' PRÄPARATION

STET-Aufschlusspuffer: 50mM Tris HCl pH 7.9, 50 mM EDTA, 8% (w/v) Saccharose, 5% (v/v) Triton X-100

Lysozymlösung: 10mg/ml Lysozym (SERVA) in destilliertem H₂O, frisch ansetzen

RNase A: 10mg/ml in destilliertem H₂O, zur DNase-Inaktivierung 5min kochen, Lagerung bei -20°C

Zur schnellen Analyse von transformierten Bakterien (*Screening*) wurden 1.5 bis 2ml einer ÜN-Kultur durch 2minütige Zentrifugation bei 14.000rpm / R9 pelletiert, in 200µl STET-Aufschlusspuffer unter Zugabe von 10µl Lysozymlösung resuspendiert und 5min bei R9

inkubiert. Zum vollständigen Aufschluss wurde die Suspension 1min gekocht. Nach einer erneuten Inkubation für 5min bei R9, folgte eine 15minütige Zentrifugation bei 14.000rpm. Das Zelltrümmer-Pellet wurde mit einem Zahnstocher entfernt und der Überstand mit 200µl gekühltem Isopropanol versetzt und gut gemischt. Der Ansatz wurde für 5min bei -20°C inkubiert und die DNA anschließend durch Zentrifugation (14.000rpm 10min 4°C) präzipitiert. Das Pellet wurde mit 400µl gekühltem, 70%igen Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und in einer Vakuumzentrifuge (Centrivap Concentrator, LABCONCO) getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50µl destilliertem Wasser aufgenommen. Nach dem analytischen Restriktionsverdau (s. Kapitel 2.11.6.1) wurde der unsauberen DNA-Präparation zur RNA-Entfernung je 1µl RNaseA-Lösung zugegeben, 5min bei R9 inkubiert und anschließend die DNA elektrophoretisch aufgetrennt (s. Kapitel 2.11.6.4).

2.11.7.2 DNA-MINIPRÄPARATION

Die saubere Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* im geringen Maßstab erfolgte laut Herstellerprotokoll zum Plasmid Mini Kit (QIAprep Spin Miniprep, QIAGEN). Die Plasmid-DNA aus 1.5ml ÜNK wurde in 50µl destilliertem H₂O aufgenommen und 5µl für die Restriktionsanalyse (s. Kapitel 2.11.6.1) bzw. 30µl zur Sequenzierung (s. Kapitel 2.11.6.8) eingesetzt.

2.11.7.3 DNA-MIDI- BZW. MAXIPRÄPARATION

Zur Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden Kits (QIAGEN Plasmid Midi bzw. Maxi Kit) verwendet. Die Präparation wurde nach den entsprechenden Vorschriften des Herstellers vorgenommen, wobei die Plasmid-DNA in 200µl (Midi) bzw. 500µl destilliertem H₂O aufgenommen wurde.

2.12 Proteinbiochemische Methoden

2.12.1 Proteinexpression

2.12.1.1 HETEROLOGE PROTEINEXPRESSION IN *E. COLI*

Glucose-Stammlösung: 40% Glucose in destilliertem H₂O, autoklavieren

IPTG-Stammlösung: 1M IPTG in destilliertem H₂O

Zur heterologen Expression humaner Proteasom-Untereinheiten wurden *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen mit T7-Expressionsplasmiden (s. Tabelle 3) transformiert (s. Kapitel 2.8.2). Eine dicht bewachsene 50ml ÜNK (s. Kapitel 2.8) wurde auf ein Volumen von bis zu 1l LB (AMP) + 0.5% Glucose so überimpft, dass die OD_{λ=600nm} 0.1 betrug. Die Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C weiter inkubiert, bis eine OD_{λ=600nm} = 0.5 erreicht wurde, und die Proteinexpression durch die Zugabe von 1mM IPTG induziert. Nach 2h Expressionsdauer wurden die Zellen geerntet (8000rpm 15min 4°C) geerntet und das Zielprotein (His₆-POMP) gereinigt (s. Kapitel 2.12.2.2).

2.12.1.2 GEKOPPELTE IN VITRO-TRANSKRIPTION/TRANSLATION (IVTT)

Proteasomale Untereinheiten (z.B. $\beta 5/\text{Mb1}$ oder $\beta 5\text{i/LMP7}$) waren kaum rekombinant in *E.coli* zu exprimieren. Deswegen wurde auf zwei verschiedene zellfreie Systeme zur *in vitro*-Expression von Proteinen zurückgegriffen, die beide auf der gekoppelten *in vitro*-Transkription (T7-Polymerase) und Translation beruhten. Das *Rapid Translation System* (RTS, ROCHE) basiert auf *E.coli*-Lysat und kam in zwei Ausprägungen zur Anwendung. *RTS 100 E.coli HY* im analytischen Maßstab (Testexpressionen und Interaktionsassays) bzw. *RTS 500 E.coli HY* im präparativen Maßstab (mit zugehörigen Reaktionsgefäßen und *RTS ProteoMaster Instrument*). Sämtliche Experimente wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Als weiteres IVTT-System kam das *TNT T7 Coupled Rabbit Reticulocyte Lysate System* (PROMEGA) zur Anwendung, wobei auch hier das Standard-Herstellerprotokoll befolgt wurde. Sowohl das RTS- als auch das TNT-System erlaubten auch die Expression radioaktiv markierter Proteine (Zugabe von ^{35}S -Methionin) bzw. die Coexpression von mehreren Proteinen in einem Ansatz.

2.12.2 Proteinisolation bzw. -präparation

2.12.2.1 ISOLATION VON PROTEINEN AUS EUKARYOTISCHEN ZELLEN

Lysepuffer: 50mM Tris, 5mM MgCl_2 , 50mM NaCl, pH 7.5, 0.1% Triton X-100, jeweils frische Zugabe von Protease-Inhibitoren (*Complete*, laut Herstellerangaben) und 10 μM MG-132 (10mM Stock in DMSO) bei der Analyse von proteasomalen Precursorkomplexen / POMP

Zur Proteinpräparation aus humanen Kulturzellen wurden diese durch Trypsinierung geerntet (wie in Kapitel 2.10 beschrieben), das Zellpellet mit 1xPBS gewaschen und anschließend in einem adäquaten Volumen Lysepuffer (ca. 50 μl pro 10^6 Zellen) aufgenommen. Die Zellen wurden in drei Frier-Tau-Zyklen aufgeschlossen (flüssiger Stickstoff oder -70°C und R9, jeweils vortexen). Nach Pelletierung der Zelltrümmer (14.000rpm 4°C 15min) wurde die Konzentration des löslichen Gesamtproteinlysates bestimmt (s. Kapitel 2.12.3.1).

2.12.2.2 NATIVE NiNTA-AFFINITÄTSREINIGUNG VON HIS₆-PROTEINEN

Lysepuffer für native Aufreinigung: 50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 10mM Imidazol, pH 8.0, frische Zugabe von Protease-Inhibitoren (*Complete*)

'PIP' Protein-Interaktionspuffer: 50mM NaH_2PO_4 , 500mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 8.0, 0.5 % Tween 20

Waschpuffer: wie Lysepuffer mit 20mM Imidazol Elutionspuffer: Lysepuffer mit 100mM bis 500mM Imidazol

Restriktionspuffer: 50mM Tris, 0.1M NaCl, 1mM CaCl_2 , pH 8.0

Sowohl analytisch (Interaktionsassay) als auch präparativ wurden verschieden exprimierte His₆-Fusionsproteine (heterolog exprimiertes His₆-POMP [2.12.1.1] bzw. *in vitro*-exprimierte His₆- $\beta 5$ -Homologe [2.12.1.2]) mittels Affinitätsreinigung über NiNTA-Agarose isoliert.

Zur präparativen Isolation von His₆-POMP aus einer *E.coli*-Expressionskultur (s. Kapitel 2.12.1.1) wurden die Bakterien zunächst im Lysepuffer gewaschen, wiederum in Lysepuffer aufgenommen, aufgeschlossen (French Press) und die Zelltrümmer abzentrifugiert (8000rpm

15min 4°C). Der lösliche Proteinüberstand wurde im *Batch*-Verfahren mit 15ml NiNTA-Agarose für 2h bei 4°C auf einem Rotationsrad inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in eine Säule (BIORAD) gegeben, intensiv mit Waschpuffer gewaschen (mdst. 100ml) und anschließend das Zielprotein durch die sequentielle Zugabe von je 10ml Elutionspuffer steigender Imidazolkonzentration eluiert (2ml Fraktionen). Bei Bedarf wurde die Proteinlösung umgepuffert (1xPBS) und konzentriert durch die Zentrifugation mit sog. Zentrifugen-Filter-Einheiten (entsprechend der Volumina: 'Microcon', 'Centricon' bzw. 'Amicon Ultra', MILLIPORE) geeigneter Porenausschlußgröße der 'Ultracel' Low Binding Cellulose-Membran (ab 5 kDa).

Die analytische Isolation von His₆-Fusionsproteinen erfolgte zur Analyse von *in vitro* Protein-Interaktionen. Jeweils zwei Proteine wurden dabei *in vitro* coexprimiert (RTS bzw. TNT, s. Kapitel 2.12.1.2), wobei nur jeweils eines als His₆-Fusionsprotein vorlag. Der Interaktionstest erfolgte ebenfalls unter nativen Bedingungen, allerdings wurden magnetische NiNTA-Agarose *Beads* (QIAGEN) und ein 'Magnetseparator' (Dynal MPC-E, DYNAL, Oslo) genutzt. Ausserdem musste zur Suppression von unspezifischen Bindungen die Stringenz des nativen Puffers nach Empfehlungen des 'QIAexpressionist – Handbuch für Expression und Reinigung His₆-getaggtter Proteine' (QIAGEN) erhöht werden. Der genutzte Puffer zeichnete sich durch gesteigerte Salz- und Detergenz-Konzentrationen aus (PIP, s.o.). Jeweils die Hälfte eines IVTT-Ansatzes (25µl) wurde mit 40µl Suspension der magnetischen NiNTA-Agarose in PIP (ad 1ml) zur Bindung 2h bei 4°C auf einem Rotationsrad inkubiert. Der Überstand wurde nach dem Einsetzen der Reaktionsgefäße in den Magnetseparator entnommen. Es schlossen sich 5 Waschschrte mit je 1ml PIP an. Zur Elution wurden verschiedene Verfahren angewendet, je nach Charakter der exprimierten Proteine. Entweder wurde das His₆-Fusionsprotein (zusammen mit dem entsprechenden Interaktionspartner) durch die Zugabe von Imidazol von der NiNTA-Agarose eluiert (s.o.) oder das Zielprotein (und damit der entsprechende Interaktionspartner) wurde durch die Inkubation mit einer spezifischen Protease vom His₆-Tag abgespalten, der dann an der NiNTA-Agarose verbleibt. Wurde das His₆-Zielprotein (z.B. His-LMP7/β5i) durch pIVEX 2.4a-Plasmide codiert (s. Tabelle 3), erfolgte diese Abspaltung durch Faktor Xa (*Restriction Protease Factor Xa Cleavage and Removal Kit*) nach Herstellerangaben. His₆-Zielproteine (z.B. His-POMP), die durch pRSetA codiert wurden (s. Tabelle 3), wurden durch die Behandlung mit Enterokinase laut Herstellerangaben abgespalten. Allerdings erfolgte die effiziente Spaltung beider Enzyme laut Herstellerangaben nicht im Phosphatpuffer (PIP), weswegen sich bei solcherart Experimenten nach dem fünften Wachschrte mit PIP ein sechster mit Restriktionspuffer (s.o.) anschloss, bevor die Restriktion (3h bei R9) durch Zugabe des entsprechenden Enzyms gestartet wurde. Abschließend wurden die so isolierten Proteine einer SDS-PAGE (s. Kapitel 2.12.3.2) unterzogen und visualisiert (s. Kapitel 2.12.3.4).

2.12.2.3 IMMUNPRÄZIPITATION (IP)

10x PBS-Stammlösung: 80g NaCl, 2g KCl, 14.4g Na₂HPO₄*2H₂O, 2g KH₂PO₄ ad 1l H₂O, pH 6.63 mit HCl einstellen, autoklavieren

Bindungspuffer: 1x PBS + 0.1% NP40, frische Zugabe von Protease-Inhibitoren (*Complete*) und u.U. 10µM Proteasominhibitor MG-132 bei der IP von Precursorkomplexen

Waschpuffer 1: 2x PBS + 0.1% NP40

Waschpuffer 2: 1x PBS

Protein A/G-Sepharose: Mix (4:1) von Protein A-Sepharose CL-4B und Protein G-Agarose in PBS (1VT Gel + 1VT PBS: 'Slurry')

Für Immunpräzipitationsstudien wurden entweder endogene Proteine humaner Zellen (s. Kapitel 2.10.1 und 2.12.2.1), *in vitro*-translatierte Proteine (s. Kapitel 2.12.1.2) oder aufgereinigte Proteinkomplexe (s. Kapitel 2.12.2.4 und 2.12.2.5) eingesetzt. Sollte zur Bestimmung von Halbwertszeiten eine IP von Proteinen metabolisch markierter Zellen (s. Kapitel 2.10.1) durchgeführt werden, wurde das Proteinlysate zunächst bezüglich der inkorporierten ³⁵S-Aktivität analysiert (*Wallac1410 Liquid Scintillation Counter*, PHARMACIA und *EcoLumeTM*, ICN). Um möglicherweise nicht exakt identische Protein-Markierungsraten in verschiedenen Proben auszugleichen, wurden bei kurzzeitigen *chase*-Zeiten (bis zu 6h) jeweils gleiche Gesamtaktivitätsmengen (*DPM*) eingesetzt (0.5 bis $2 \cdot 10^7$ *DPM* im Gesamtlysate je IP-Ansatz). Die zu präzipitierenden Proteine wurden in 1ml Bindungspuffer (incl. Inhibitoren, s.o.) verdünnt, zur Suppression unspezifischer hydrophober Wechselwirkungen je 10µl BSA-Lösung (10mg/ml) zugegeben und diese Lösung 5min bei R9 auf dem Rad inkubiert. Anschließend wurden je 3 bis 5µl Antikörper (z.B. MP1, C8, LMP7, MB1, s. Tabelle 7) zugegeben und der Ansatz ÜN bei 4°C unter Rotieren ('Rad') inkubiert. Nach der Zugabe von je 50µl Protein A/G-Sepharose ('Slurry', s.o.) wurde der Ansatz weitere 2h bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Es schlossen sich 3 Waschschrte mit Waschpuffer 1 an, wobei die Sepharose durch Zentrifugationsschritte pelettiert wurde (2500 rpm 2min 4°C). Einem Waschschrte mit Waschpuffer 2 folgte ein Waschschrte mit destilliertem Wasser, bevor die Proben in je 20µl SDS-Probenpuffer aufgekocht wurden und die Proteine im Überstand in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden (s. Kapitel 2.12.3.2). Bei der 'Elution' durch Kochen in SDS-Probenpuffer sind im Überstand ebenfalls die leichten und schweren Ketten des immunpräzipitierenden Antikörpers. Wurde eine IP mit nicht-radioaktiven Proteinen durchgeführt, stellte dies ein Problem bei einem sich anschließenden Immunoblot zur Detektion der Zielproteine dar. Deshalb wurde in solchen Fällen nicht durch Kochen 'eluiert', sondern die *Beads* nach Zugabe von SDS-Probenpuffer ohne DTT ÜN bei R9 inkubiert. Bei dieser milden Methode verbleibt der Großteil der Antikörper an der Sepharose.

2.12.2.4 SACCHAROSE-DICHTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION

Gradientenpuffer: 50mM Tris, 50mM NaCl, 5mM MgCl₂ pH 7.5

Im Gradientenmischer wurden zwei Saccharose-Lösungen (40% und 10% Saccharose in Gradientenpuffer) miteinander vermischt und so lineare Saccharosegradienten in den

Ultrazentrifugen-Röhrchen (*Polyallomer Centrifuge Tubes*, BECKMAN, für SW40 bzw. SW28-UZ-Rotoren) aufgebaut. Die gekühlten Gradienten wurden vorsichtig mit dem Proteinlysats überschichtet (max. 4mg bei SW40-, max. 12mg bei SW28-Gradienten). Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 4°C und 40.000rpm für 16h (SW40) bzw. 25.500rpm für 39h zur präparativen Auftrennung im SW28-Gradienten. Anschließend wurden die Gradienten in einer entsprechenden Vorrichtung von unten 'gezapft', d.h. das Röhrchen wurde mit einer feinen Kanüle durchstoßen und der Gradient mit Hilfe einer Durchlaufpumpe in Aliquots á 0.5ml (SW40) bzw. 1 bis 2ml (SW28) fraktioniert.

2.12.2.5 AUFREINIGUNG VON 20S-PROTEASOMEN UND PRECURSOR-KOMPLEXEN

Lysepuffer: 50mM Tris, 5mM MgCl₂, 50mM NaCl, pH 7.5, 0.1% Triton X-100, jeweils frische Zugabe von Protease-Inhibitoren (*Complete*) und 10µM MG-132 bei der Analyse von proteasomalen Precursorkomplexen

Puffer A: 50mM Tris, 5mM MgCl₂, pH 7.5

Puffer B: 50mM Tris, 5mM MgCl₂, 1M NaCl, pH 7.5

Das bestehende Standard-Protokoll zur Isolation von 20S-Proteasomen wurde in der vorliegenden Arbeit methodisch so modifiziert, dass sowohl reife 20S-Proteasomen als auch proteasomale Precursorkomplexe aus humanen Kulturzellen isoliert werden konnten. Zur Stabilisierung von Precursorkomplexen wurden alle Arbeitsschritte auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Neben Protease-Inhibitoren (*Complete*) wurde in jedem einzelnen Arbeitsschritt 10µM Proteasom-Inhibitor MG-132 zum Proteinlysats zugegeben. Für eine solche Aufreinigung wurden $2 \cdot 10^9$ bis $1 \cdot 10^{10}$ Zellen eingesetzt. Um diese Quantität zu erreichen, wurden T2- bzw. HeLaS3-Zellen, die in Suspension wachsen, in Spinnerflaschen mit einem Kulturvolumen von bis zu 3l kultiviert (s. Kapitel 2.10). Mehrere Zellpellets (Lagerung bei -80°C) mussten für eine Präparation vereinigt werden. Die Zellen wurden in ca. 75ml Lysepuffer aufgenommen und nach der in Kapitel 2.12.2.1 beschriebenen Methode aufgeschlossen, wobei der Aufschluß der Zellen durch die zusätzliche Behandlung mit einem Dounce-Homogenisator unterstützt wurde. Lösliches Protein wurde anschließend durch 20minütige Zentrifugation bei 12.000rpm 4°C von den Zelltrümmern abgetrennt und der Überstand einer DEAE-Anionenaustauschchromatographie unterzogen. Im Gegensatz zur Standard-20S-Präparation, die im DEAE-*Batch*-Verfahren durchgeführt wird, wurde bei dieser Isolation eine TOYOPEARL DEAE 650S-Säule (TOSOH, Wertheim) mit angeschlossener Pumpe (PUMP P-50, AMERSHAM) und Fraktionssammler (GradiFrac, AMERSHAM) genutzt. Die DEAE-Säule wurde zunächst in Puffer A, Puffer B und erneut in Puffer A äquilibriert (je ca. 15 Säulenvolumen). Anschließend wurde der lösliche Protein-Überstand auf die Säule geladen (Fluß 2ml/min, 0% Puffer B) und nicht gebundene Proteine mit Puffer A ausgewaschen.

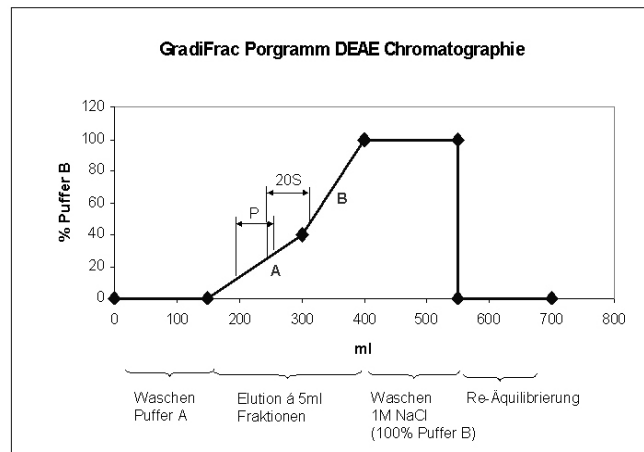


Abbildung 9: Gradientenprofil der DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie zur Anreicherung von proteasomalen Precursorkomplexen und 20S-Proteasomen. Die Elution von proteasomalen Precursorkomplexen ['P'] bei ca. 150mM bis 300mM NaCl bzw. von reifen 20S-Proteasomen ['20S'] bei ca. 250mM bis 450mM NaCl ist angegeben.

Über zwei lineare Salzgradienten (Segment A: über 150ml von 0% auf 40% Puffer B sowie Segment B: über 100ml von 40% auf 100% Puffer B, s. Abbildung 9) erfolgte die Elution angereicherter proteasomaler Precursorkomplexe bzw. reifer 20S-Proteasomen. Eine Immunoblot-Analyse (s. Kapitel 2.12.3.3) dieser Fraktionen (je 5ml) zeigte, dass Precursorkomplexe (mit POMP und Pro- $\beta 1/\delta$) hauptsächlich bei 150mM bis 300mM NaCl (Segment A, ca. 15 bis 30% Puffer B) und reife Proteasomen (kein POMP und prozessiertes $\beta 1/\delta$) hauptsächlich bei 250mM bis 450mM NaCl (ca. 25% bis 45% Puffer B) eluieren. Trotz der Anwesenheit des Proteasom-Inhibitors MG-132 konnte zumindest die Anreicherung von reifen 20S-Proteasomen in den einzelnen Fraktionen durch eine Proteasom-Aktivitätsbestimmung mit fluorogenen Peptid-Substraten (s. Kapitel 2.13.1) bestätigt werden, da mit der gewählten Konzentration des reversiblen Inhibitors MG-132 keine vollständige Hemmung des 20S-Proteasoms erzielt wurde. Precursorkomplex-haltige Fraktionen bzw. 20S-Proteasom-haltige Fraktionen wurden jeweils vereinigt und weiter aufgereinigt, und dafür in Puffer A verdünnt. Zunächst wurde mit den einzelnen, in Puffer A verdünnten Proben eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung unter Rühren bei 4°C durchgeführt. Im ersten Schritt wurden nicht-proteasomale Proteine durch die langsame Zugabe von Ammoniumsulfat (bis zu 38% Sättigung) ausgefällt (Zentrifugation 15.000rpm 4°C 20min). Dem Überstand wurde weiter langsam Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 80% zugegeben und dadurch Proteasom bzw. Precursorkomplexe präzipitiert. Die Proteine, die durch erneute Zentrifugation (15.000rpm 4°C 20min) pelletiert wurden, wurden in je 2ml Puffer A aufgenommen und in einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (40 bis 10%, SW28, s. Kapitel 2.12.2.4) aufgetrennt. Deren Fraktionen wurden erneut mittels Immunoblot analysiert.

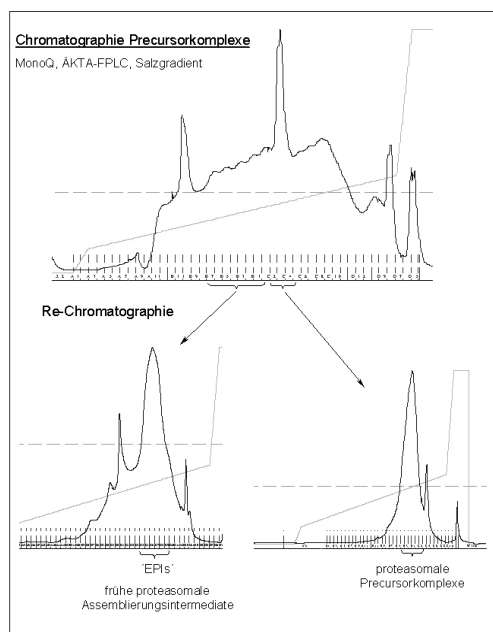


Abbildung 10: Elutionsprofile von Precursorkomplexen in der sequentiellen Anionenaustausch-Chromatographie mit MonoQ-Säule, ÄKTA-FPLC und linearen Salzgradienten (Erläuterungen s.Text).

Dichtegradienten-Fractionen mit proteasomalen Precursorkomplexen (mit POMP und Pro- $\beta 1/\delta$) bzw. Fractionen mit reifen 20S-Proteasomen (kein POMP und prozessiertes $\beta 1/\delta$) wurden abschließend jeweils vereinigt, in Puffer A verdünnt, filtriert (Sterilfilter 4.5, 0,2 μ m) und in einer zweiten Anionenaustausch-Chromatographie (MonoQ_HR 5/5-Säule, ÄKTA-FPLC) getrennt. Dafür wurden ebenfalls die Puffer A bzw. B verwendet. Die Probe wurde dabei mit Hilfe eines 'Superloops' auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule geladen, anschließend mit Puffer A (Fluß 1ml/min) gewaschen und wiederum über zwei lineare Salzgradienten eluiert (Segment A: 10 bis 40% Puffer B, 40ml Länge; Segment B: 40 bis 100% Puffer B, 2ml Länge). Über einen Fraktionssammler wurden Fraktionen á 1ml gesammelt. Reifes 20S-Proteasom eluierte dabei bei ca. 30 bis 35% Puffer B, Precursorkomplexe deutlich früher (ca. 20 bis 30% Puffer B). Die Precursorkomplexe wurden einer Rechromatographie unterzogen (s. Abbildung 10). Anschließend wurden die Proteinproben wie unter 2.12.2.2 beschrieben, gegen PBS dialysiert und eingengt.

2.12.3 Analyse von Proteinen

2.12.3.1 BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN

Die Konzentrationsbestimmung von gelösten Proteinen erfolgte nach Bradford über die Absorptionsverschiebung eines Farbstoffes (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate*) aufgrund der Bindung an Proteine. Hierfür wurden jeweils 1 bis 5 μ l der Probe mit 200 μ l Farbstoffkonzentrat ad 1ml H₂O gemischt, für einige Minuten inkubiert und anschließend die

$OD_{\lambda=595nm}$ der Proben in Acryl-Küvetten gegen den Leerwert (Farbstoff in H_2O) gemessen (Photometer). Anhand einer Eichgeraden, die mit BSA-Lösungen bekannter Konzentration (10, 50, 100, 250, 500 bzw. 1000ng/ μ l) aufgenommen worden war, konnten die Konzentrationen der Proben ermittelt werden. Dabei galt die 'Faustregel', dass eine Proteinlösung von 1mg/ml eine $OD_{\lambda=595nm}$ von 0.05 aufweist. In einigen Fällen wurde die so bestimmte Proteinkonzentration über die Messung der $OD_{\lambda=280nm}$ verifiziert, wobei für 20S-Proteasomen eine $OD_{\lambda=280nm}$ von 1.0 einer Konzentration von ca. 1.4mg/ml entspricht.

2.12.3.2 SDS-PAGE UND COOMASSIE-FÄRBUNG

Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE (10x): 250mM Tris, 2M Glycin, pH 8.8, 1% SDS

Probenpuffer für SDS-PAGE (6x): 375mM Tris pH 6.8, 12% SDS, 30% Glycerol, 500mM DTT, 0.001% Bromphenolblau

4x Trenngelpuffer: 1.5M Tris HCl, pH 8.8, 0.4% SDS 4x Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris HCl, pH 6.8, 0.4% SDS

Acrylamid-Lösung 4K: Mix 37.5 Acrylamid : 1.0 Bisacrylamid (AppliChem)

Polymerisation: TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylen-di-amin), 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Coomassie-Färbelösung: 0.15% Coomassie R250 / ServaBlueR, 30% Methanol, 10% Essigsäure

Coomassie-Entfärber: 40% Methanol, 10% Essigsäure

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese trennt Proteine ihrer molekularen Masse entsprechend auf und basierte auf dem diskontinuierlichen Laemmli-System mit Tris-Glycin-Puffern (s.o.), bei dem ein 5%iges Sammelgel (s.o.) ein entsprechendes Trenngel (s.o.) unterschiedlicher Prozentigkeit (je nach aufzutrennender Proteingröße zwischen 10 und 15% Acrylamid) überschichtete. Die Dicke der Gele betrug dabei zwischen 0.75 und 1.0mm. Es wurden sog. Mini-Gelsysteme (HOEFER Mighty Small System S250 bzw. SE 260, AMERSHAM) mit 7.5 bzw. 10cm langen Gelen verwendet. Meist wurden jeweils 50 μ g Gesamtproteinlysate eingesetzt, um Proben (z.B. Zellen mit und ohne IFN γ -Stimulation) miteinander vergleichen zu können. Die Proteinproben und der Marker (s. Kapitel 2.7) wurden vor dem Auftrag in Probenpuffer für 5min bei 100°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte unter konstanter Spannung von 100 bis 125V.

Die Detektion der aufgetrennten Proteine in SDS-Gelen erfolgte meist mittels Coomassie-Färbung, seltener wurde silbergefärbt bzw. mittels *SYPRO-Orange protein gel stain* (MOLECULAR PROBES). Zur Coomassie-Färbung wurden die Gele auf einem Taumler (ST5 CAT, NEOLAB) in Coomassie-Färbelösung bis zur vollständigen Färbung und anschließend unter mehrfachem Wechsel des Coomassie-Entfärbers bis zur gewünschten Intensität der Proteinbanden inkubiert. Beide Prozesse konnten durch kurzzeitiges Erhitzen (Mikrowelle) beschleunigt werden. Getrocknet wurden die Gele zur Konservierung bis zu 2h unter Vakuum bei 80°C (Geltrockner 'Drystar' HÖLZEL), wobei sowohl das Gel als auch die umhüllenden Cellulose-Folien (*Gel Drying film*, PROMEGA) vorher in einer 10%igen Glycerollösung äquilibriert wurden.

2.12.3.3 TRANSFER UND IMMUNOBLOT (WESTERN BLOT)

Transferpuffer für Western Blot: 25mM Tris, 200mM Glycin, 0.1% SDS, 20% Methanol, pH 8.3

10x TBS: 0.5M Tris, 1.5M NaCl, pH 7.6 TBS-T-Waschpuffer: 1x TBS, 0.5% Tween 20

Blocking – Lösung: 1xTBS, 0.5% TWEEN 20, 2.5% Magermilchpulver (*skim milk*, DIFCO), 0.5mM NaN₃

5x Amidoschwarz-Stammlösung: 0.1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Essigsäure

Zunächst wurde das zu blottende SDS-Polyacrylamidgel kurz in Transferpuffer äquilibriert, während die PVDF-Membran zunächst in Methanol aktiviert (5min) und anschließend ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert wurde. Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine des Gels auf die Membran (*Western Blot 'semi dry'*) erfolgte in einem kontinuierlichen Puffersystem, wobei zwischen Gel und Kathode sowie zwischen Membran und Anode jeweils 3 Lagen in Transferpuffer getränkten *Gel Blotting*-Papiers befanden. Der Transfer (Blot-Apparatur PEQLAB) erfolgte für 1h bei konstanter Stromstärke von 400mA (ca. 1mA / cm² Transferfläche). Zum Nachweis des erfolgreichen und gleichmäßigen Proteintransfers wurde die Membran nach dem Blotten mit 1x Amidoschwarzlösung für ca. 10min bei R₉ angefärbt (Taumler: ST5 CAT, NEOLAB). Damit konnte ebenfalls bestätigt werden, dass zu vergleichende Proteinmengen auf des Polyacrylamid-Gel aufgetragen wurden (s. Kapitel 2.12.3.2). Anschließend wurde die Membran in Wasser entfärbt und für die sich anschließende Immunfärbung freie Proteinbindungsstellen der Membran blockiert. Dafür wurde die Membran mindestens 1h bei R₉ in Blocking-Lösung geschwenkt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (s. Kapitel 2.6.1, verdünnt in Blocking-Lösung) erfolgte ÜN unter Schwenken bei 4°C. Anschließend wurde die Membran zweimal 20min in TBS-T-Waschpuffer bei R₉ gewaschen. Die Inkubation mit dem adäquaten Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (s. Kapitel 2.6.2), verdünnt 1:10 000 in Blocking-Lösung) erfolgte für 1h bei R₉ auf einem Taumler, woran sich erneutes Waschen (s.o.) anschloss. Zur Blotentwicklung, d.h. zur Peroxidase-vermittelten Chemilumineszenz-Reaktion, wurde das 'ECL PLUS'- System (*ECL Plus Western Blotting Detection Kit*) nach Herstellerprotokoll (Inkubation 5min) und zur Detektion *Kodak Scientific Imaging* Filme (X-OMAT UV) verwendet (Exposition 1 bis 15min).

2.12.3.4 AUTORADIOGRAPHIE UND PHOSPHOIMAGER-ANALYSE

Polyacrylamidgele mit ³⁵S-makierten Proteinen (Interaktionsassay [Kapitel 2.12.2.2] oder IP [Kapitel 2.12.2.3] metabolisch markierter Proteine [Kapitel 2.10.1]) wurden bei R₉ zur Fixierung 30min in 40% Methanol / 10% Essigsäure und anschließend 15min in einer Scintillatorflüssigkeit ('Amplify') geschwenkt. Das Gel, aufgelegt auf *Gel Blotting*-Papier, wurde unter Vakuum bei 80°C für 2h getrocknet. Anschließend der *Kodak BioMAX* Film in einer Filmkassette mit signal-verstärkenden *Intensifying Screens* (sog. *Hypercassettes for Autoradiography*) auf dem Gel für mehrere Tage bei -80°C exponiert und der Film anschließend entwickelt. Alternativ wurden die Signale in getrockneten Gelen mit ³⁵S-

markierten Proteinen auch per Phosphoimager – Analyse detektiert. Dafür wurde ein *Imaging Plate for Bio Imaging Analyzer* (BAS-MS, Fujifilm) ÜN bei R9 auf dem getrockneten Gel (s.o.) exponiert und die Signale im IP-Modus im Phosphoimager (*FLA3000* Fujifilm, Software *BAS Reader*) detektiert. Die quantitative Auswertung der Signalintensitäten (s. Kapitel 2.13.2) erfolgte mittels der Software *AIDA* (RAYTEST).

2.12.3.5 NATIVE PAGE

Die Proteinanalyse mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte unter Nutzung des Phast-Systems (AMERSHAM). Sowohl Polyacrylamid-Gradienten-Gele (*PhastGel Gradient* 4-15%, 8-25% und 10-15%) als auch homogene Polyacrylamid-Gele (*PhastGel Homogeneous* 7.5, 12.5 und 20%) dienten zur Auftrennung von Proteinen unter nativen Bedingungen (*PhastGel Native Buffer Stripes*). Sämtliche Elektrophoresen erfolgten nach Herstellerangaben (*Phast System User Manual, Application Note # 130, Separation Technique Files #120, # 121*). Als Größenstandards dienten Proteine des Kits '*High Molecular Weight Calibration Kit for Native Electrophoresis*'. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran wurde ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt (*Phast System User Manual, Development Technique Files #220, # 221, # 230*). Die Coomassie-Färbung der Gele bzw. der Immunoblot erfolgte wie in den Kapiteln 2.12.3.2 bzw. 2.12.3.3 beschrieben.

2.12.3.6 PROTEINIDENTIFIZIERUNG

Zur Identifizierung einzelner Komponenten von putativen frühen proteasomalen Assemblierungsintermediaten 'EPIs' wurden einzelne Proteinbanden aus Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten. Durch Frau Dr. K. Janek (Abteilung Massenspektrometrie, Institut für Biochemie) wurden diese Proteine mittels Peptidmassen-Fingerprint-Analyse charakterisiert. Dafür wurden die Gelstücke zunächst gewaschen, ein tryptischer Verdau im Gel durchgeführt und die resultierenden Peptide mittels MALDI-TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, APPLIED BIOSYSTEMS) analysiert.

2.13 Funktionelle Assays

2.13.1 Proteaseassay mit fluorogenen Peptidsubstraten

Substrate: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Z-Gly-Gly-Leu-AMC, Bz-Val-Gly-Arg-AMC (BACHEM, jeweilige Stocklösung 20mM in DMF)

Assaypuffer: 50mM Tris, 5mM MgCl₂, pH 7.5

Zunächste wurde eine 40µM Substratlösung durch Verdünnung der Stocklösung in Assaypuffer hergestellt und je 100µl dieser Substratlösung pro Kavität einer schwarzen 96well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Dazu wurde die entsprechende Probe (10µl einer Dichtegradientenfraktion bzw. 10µg gereinigten Proteasoms) hinzugegeben und die durch Alufolie lichtgeschützte Platte bei 37°C zwischen 30min und 2h inkubiert. Die Fluoreszenz der

chromophoren Gruppe AMC, die durch das Proteasom vom Substrat abgespalten wurde, wurde in einem Fluostar- Platten- Reader (SLT) bei einer Emissions-Wellenlänge von $\lambda=460$ nm gemessen, wobei die Anregung mit einer Wellenlänge von $\lambda=390$ nm erfolgte. Die Anzahl der Blitze betrug im allgemeinen 10 und die Verstärkung (*gain*) zwischen 20 und 40.

2.13.2 Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen

Die Bestimmung der Halbwertszeit verschiedener Proteine umfasste folgende Schritte: metabolische ^{35}S -Markierung der Zellen (s. Kapitel 2.10.1), spezifische Immunpräzipitation (s. 2.12.2.3), SDS-PAGE (s. 2.12.3.2) und Phosphoimager-Analyse (s. 2.12.3.4). Die durch die Software AIDA evaluierten Bandenintensitäten des Zielproteins (z.B. POMP bzw. proteasomale Precursorkomplexe) wurden integriert (Pixeldichte pro Fläche), um die entsprechenden Hintergrundintensitäten der einzelnen Spuren bereinigt und logarithmiert [LN], um eine näherungsweise lineare Abhängigkeit zwischen Intensität und Zeit zu erhalten. Der negative Anstieg der genähert linearen Funktion (Trendlinie) gilt als Maß für die Abbaurate eines Proteins, der Quotient aus zwei Anstiegen (z.B. Zellen $+\text{IFN}\gamma$ / $-\text{IFN}\gamma$) als Faktor für die schnellere Degradation in induzierten Zellen. Die Funktionsgleichung der Trendlinie erlaubte ebenfalls die Bestimmung genäherter Halbwertszeiten des Proteins.

2.13.3 Protein-Protein-Interaktionen

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen zwischen einzelnen proteasomalen Untereinheiten wurden sowohl *in vitro*-Bindungsstudien (in Kapitel 2.12.2.2 beschrieben) als auch *in vivo* Analysen, basierend auf dem *MATCHMAKER Yeast Two-Hybrid System* von CLONTECH durchgeführt.

2.13.3.1 INTERACTION TRAP

Z-Puffer: 16.1 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.5 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.75 g/l KCl, 0.246 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4, autoklavieren

X-GAL-Stocklösung: 20 mg/ml X-GAL (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) in DMF (N,N-Dimethylformamid), Lagerung: dunkel, -20°C

Z-Puffer / X-GAL-Lösung: 100ml Z-Puffer + 0.27ml β -Mercaptoethanol + 1.47ml X-GAL-Stocklösung

Vereinfachte Hefe 2-Hybrid-Experimente (Y2H, *Yeast Two-Hybrid*) mit zwei bekannten Proteinen, sog. *Interaction Trap*-Analysen, nutzen die Expression von Hefe-Reportergenen als Phänotyp zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Diese Methode beruht auf der Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen mit Plasmiden codierend für GAL4_AD- bzw. GAL4_BD, die N-terminal an die zwei zu untersuchenden Proteine fusioniert sind. Der genutzte HF7c-Hefestamm (s. Kapitel 2.9) ist auxotroph für Histidin (His^-), Tryptophan (Trp^-) und Leucin (Leu^-). Das endogene *gal4*-Gen ist ebenfalls inaktiviert. Die hier verwendeten Plasmide codieren, neben den entsprechenden GAL4_AD/GAL4_BD-Fusionsproteinen, für die Prototrophiemarker Leu bzw. Trp und erlauben somit eine Kontrolle der Cotransformation

anhand des Wachstums auf Minimalmedium. Besteht eine Interaktion der beiden bekannten (Fusions)Proteine, wird ein funktioneller GAL4-Transkriptionsfaktor rekonstituiert und die Interaktionsreportergene *HIS3* (unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors [UAS und TATA-Box]) und *lacZ* (unter der Kontrolle von *GAL4-responsive elements* und *CYC1*-TATA-Box) werden aktiviert.

Zunächst wurden für alle Proformen humaner β -Untereinheiten (inklusive der N-terminalen Prosequenzen) Plasmide, codierend für AD- (Plasmid pACT2 mit Marker LEU) bzw. BD-Fusionsproteine (Plasmid pAS2-1 mit Marker TRP) generiert (s. Tabelle 5). Die entsprechenden humanen α -Untereinheiten wurden vom Kooperationspartner AG Prof. Mayer, Nottingham, zur Verfügung gestellt (Apcher et al 2004, s. Tabelle 4). Die Konstrukte für POMP waren im Labor vorhanden (E.Witt, unpublizierte Daten, s. Tabelle 4).

Sämtliche Hefe-Experimente folgten den Protokollen des Herstellers (BD BIOSCIENCES/CLONTECH Yeast Protocols Handbook, 2001). Die Herstellung kompetenter Hefen und deren Transformation ist in Kapitel 2.9 beschrieben. Alle Interaktionen wurden in drei unabhängigen Experimenten untersucht, die sich in der Art der Transformation unterschieden. Zwei Experimente wurden mit sequentieller Transformation durchgeführt, wobei zuerst mit AD- bzw. erst mit BD-Plasmiden transformiert wurde. Diese „Einfach-Transformanten“ wurden im entsprechenden Selektionsmedium (SD-LEU bzw. SD-TRP, s. Kapitel 2.9) kultiviert. Weiterhin wurden alle „Einfach-Transformanten“ auf eine mögliche transaktivierende Aktivität bereits des einzelnen Fusionsproteins untersucht. Eine Transaktivierung des GAL4-Reporters resultierte in prototrophem Wachstum bezüglich *HIS* (SD-LEU-*HIS* bzw. SD-TRP-*HIS*). BD- $\alpha 5$ bzw. BD- $\beta 1i$ (LMP2) waren transaktivierend und wurden somit in den weiteren Experimenten nicht berücksichtigt. In einem zweiten Schritt wurden von den „Einfach-Transformanten“ kompetente Zellen hergestellt, diese mit dem entsprechenden zweiten Plasmid (BD- bzw. AD-Plasmide) transformiert. Jeweils die Hälfte dieser Transformationsansätze wurde auf Selektionsplatten bez. Cotransformation (SD-LEU-TRP) sowie auf Selektionsplatten bez. Interaktion (SD-LEU-TRP-*HIS*) ausgestrichen. Beim dritten Experiment, in dem die AD- und BD-Plasmide simultan cotransformiert wurden, wurde ebenso verfahren. Nach 5 bis 15 Tagen wurde das Wachstum auf beiden Platten beurteilt. Indizierte das Wachstum einer Doppeltransformante auf dem Interaktionsselektionsmedium (SD-LEU-TRP-*HIS*) eine Interaktion der beiden Proteine, wurde anschließend ein sog. *colony-lift filter assay* durchgeführt. Diese Methode beruht auf der direkten Überführung (Abdruck) der Hefen von der Agarplatte auf ein rundes, steriles Filterpapier (Grade 410 paper filter, VWR INTERNATIONAL Whatman #5). Anschließend wurden die an dem Filter haftenden Hefen in flüssigem Stickstoff für 10sec aufgebrochen. Nach dem Trocknen wurde dieser Filter mit der Unterseite luftblasenfrei auf einen zweiten, in Z-Puffer / X-GAL-Lösung getränkten Filter plaziert und für mehrere Stunden bei R9 inkubiert. Die in den aufgebrochenen Hefen exprimierte β -Galactosidase katalysierte dabei die Umsetzung des X-GAL-Farbstoffes zu

einem blauen Produkt (Dibrom-Dichlorindigo). Da sich das β -Galactosidase-codierende *lacZ*-Gen im HF7c-Stamm unter der Kontrolle eines sehr schwachen GAL4-abhängigen Minimalpromotors (artifizielle *upstream* aktivierende Sequenz $\text{UAS}_{\text{G 17mer [x3]}}$ mit *CYC1*-TATA-Box, s.o.) befindet und damit nur schwach exprimiert wird, ist der Filterassay sehr stringent. Eine intensive Blaufärbung der Hefen aufgrund der Expression des β -Galactosidase-Reporters ist somit ein genauerer Indikator für eine Interaktion beider Bindungspartner als das prototrophe Wachstum auf dem Interaktionsselektionsmedium (SD-LEU-TRP-HIS), da die Expression des *HIS*-Reportergens durch einen vollständigen *GAL1*-Promotor kontrolliert wird. Das bedeutet aber auch, dass schwache oder transiente Protein-Protein-Interaktionen in einem Filterassay u.U. nicht detektiert werden können, wenn die Menge an funktionellem GAL4-Transkriptionsfaktor und damit an exprimierter β -Galactosidase zu gering ist für diesen sehr sensitiven Nachweis.

2.13.4 FACS-Analysen

2.13.4.1 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON ZELLEN

10x PBS: 80g NaCl, 2g KCl, 14.4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2g KH_2PO_4 ad 1l H_2O , pH 6.63 (HCl), autoklavieren

PBA: 0.5% BSA (w/v) in 1x PBS

Zur Untersuchung der Oberflächenexpression von MHC I-Molekülen auf humanen Zellen wurden die Zellen geerntet (s. Kapitel 2.10), in frischem Medium aufgenommen und gezählt. Je 1 bis $3 \cdot 10^5$ Zellen wurden in eine Kavität einer 96well-Platte (U-Boden) gegeben, zentrifugiert (1200rpm 4min 4°C) und der Überstand abgeschwenkt. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und unter Abdeckung der Platte mit Alufolie. Nach einem Waschschriff mit 200 μ l PBA wurden 50 μ l der in PBS/BSA verdünnten Primärantikörper (s. Kapitel 2.6.3, Verdünnung nach Herstellerprotokoll zwischen 1 : 10 und 1 : 250) zugegeben, die Zellen resuspendiert und die Platte auf Eis 30min inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l PBA zugegeben, nach erneuter Zentrifugation der Überstand abgeschwenkt und nochmals mit 200 μ l PBA gewaschen. Wurde kein FITC-markierter Primärantikörper verwendet, wurden 50 μ l des 1:200 in PBA verdünnten FITC-markierten Sekundärantikörpers (s. Kapitel 2.6.3) zugegeben und 30min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in PBA resuspendiert und die Fluoreszenz am FACS (FACSCalibur) gemessen.

2.13.4.2 ANALYSE DER PROLIFERATION HUMANER ZELLEN

Die Proliferation von Zellen sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* kann durch die Färbung mit CFDA-SE (syn: CFSE, *Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) analysiert werden. Dieser in DMSO gelöste, farblose und nicht-fluoreszierende Farbstoff diffundiert passiv in die Zellen. Dort werden dessen Acetat-Gruppen durch intrazelluläre Esterasen abgespalten, wodurch der Farbstoff nun stark fluoresziert. Die Succinimidyl-Gruppen reagieren wiederum mit

Amingruppen von cytoplasmatischen und membrangebundenen Zellproteinen zu stabilen Komplexen. Diese fluoreszierenden Konjugate sind stabil und werden bei jeder Teilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben, wodurch sich die mittlere Fluoreszenzintensität pro Zellteilung halbiert. Somit kann man über mehrere Wochen die Proliferation der markierten Zellen verfolgen.

Die hier durchgeführten Experimente dienten der Analyse eines möglichen wachstumsinhibierenden Einflusses von IFN γ auf die untersuchten Zellen. Dafür wurde ein Teil der HeLa-, T2- bzw. T2 2/7-Zellen (s. Kapitel 2.10) für 24h mit 150 U/ml IFN γ im Kulturmedium stimuliert, der andere Teil wurde ohne Zugabe des Cytokins in Vollmedium kultiviert. Anschließend wurden beide Zellpopulationen mit PBS gewaschen und durch Trypsinierung geerntet. Die 15minütige Färbung der Zellen erfolgte in Suspension bei 37°C nach Herstellerprotokoll (*Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit*). In mehreren Experimenten wurde dabei die optimale Reagenz-Konzentration mit 7.5 μ M CFDA-SE in 1x PBS (CFDA-SE-Stocklösung nach Protokoll 10mM CFDA-SE in DMSO) ermittelt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, in Vollmedium aufgenommen und für 30min bei 37°C inkubiert, um eine vollständige intrazelluläre Modifizierung des Farbstoffes zu gewährleisten. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Zellen aliquotiert und in Vollmedium weiter kultiviert. Direkt nach der Färbung (und damit unmittelbar nach dem 24stündigen IFN γ -Stimulus) wurde die Fluoreszenzintensität (FITC = FL1) der ersten Probe am FACS (FACSCalibur) gemessen. Sukzessive wurde alle 24h die Fluoreszenz der Zellen bestimmt, so dass der 5. Wert 96h nach der Färbung gemessen wurde.

3 ERGEBNISSE

3.1 Initiation der eukaryotischen 20S-Proteasom-Assemblierung

3.1.1 *in vivo*- Protein-Protein-Interaktionen zwischen einzelnen humanen 20S-Untereinheiten

Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen zu spezifischen Interaktionen zwischen einzelnen humanen 20S-Proteasom-Untereinheiten publiziert waren, wurden diese mittels eines vereinfachten *Yeast Two-Hybrid-Assays* (Hefe 2-Hybrid) analysiert. Die sog. *Interaction Trap* - Methode ist in Kapitel 2.13.3 beschrieben. Zunächst wurden für alle Proformen humaner β -Untereinheiten Plasmide, codierend für AD- (Plasmid pACT2 mit Marker LEU) bzw. BD-Fusionsproteine (Plasmid pAS2-1 mit Marker TRP) generiert (s. Kapitel 2.4). Die entsprechenden humanen α -Untereinheiten wurden vom Kooperationspartner AG Prof. Mayer, Nottingham, zur Verfügung gestellt (Apcher, et al., 2004). Die Konstrukte für POMP waren im Labor vorhanden (E.Witt, unpublizierte Daten). Alle Plasmide wurden zunächst singular in Zellen des Hefe 2-Hybrid-Stammes HF7c- transformiert, um eine mögliche Transaktivierung des GAL₄-Reporters zu prüfen, die in prototrophem Wachstum bezüglich HIS in den Einfachtransformanten resultiert. BD_ α 5 und BD_ β 1i (LMP2) waren transaktivierend und wurden somit im weiteren Experiment nicht berücksichtigt. Exemplarisch stellt Abbildung 11 die Merkmale, die zur Beurteilung von möglichen Protein-Protein-Interaktionen herangezogen wurden, dar. War die Cotransformation erfolgreich (11 A, D bzw. G), aber erschienen keine Kolonien auf der Interaktionsselektionsplatte (11 B), war eine Interaktion der beiden Proteine ausgeschlossen und die Kolonien verfärbten sich entsprechend auch nicht im β -Galactosidase-Filterassay (11 C).

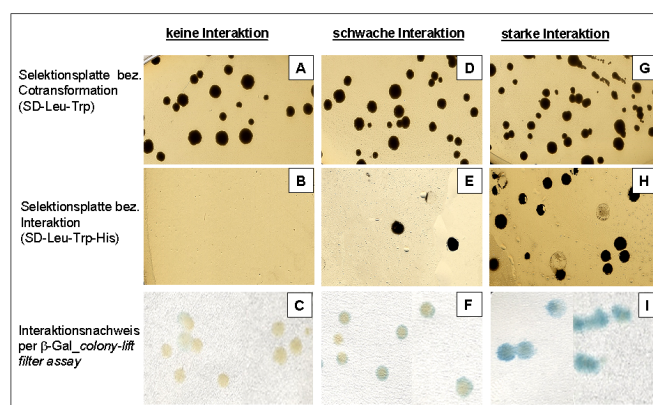


Abbildung 11: Exemplarische Beispiele einer Hefe 2-Hybrid-Studie zur Protein-Protein-Interaktion humaner 20S-Proteasom-Untereinheiten. Die Cotransformation beider Plasmide, codierend für die einzelnen Bindungspartner, wurde auf Selektionsplatten (SD-Leu-Trp) überprüft (obere Reihe). Als erstes Kriterium für eine mögliche Interaktion diente das prototrophe Wachstum auf Interaktionsselektionsmedium (SD-Leu-Trp-His, mittlere Reihe). Die Blaufärbung im anschließenden β -Galactosidase-Filterassay (untere Reihe) ist ein wesentlich stringenterer Nachweis der Interaktion beider Proteine.

Erschienen zusätzlich Kolonien auf der Interaktionsselektionsplatte (3.1 E bzw. H) und färbten sich diese im *colony-lift filter assay* intensiv blau (11 I), lag eindeutig eine Bindung der beiden Proteine vor. Schwache Interaktionen waren dadurch gekennzeichnet, dass die cotransformierten His-prototrophen Zellen nur eine geringe Enzymaktivität und damit eine schwache Blaufärbung aufwiesen (3.1 F).

Die in Abbildung 12 schematisch dargestellten Interaktionen α - β , β - β bzw. POMP- α und POMP- β stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die sich in der Art der Transformation unterschieden (sequentielle Transformation zuerst mit AD-Konstrukten bzw. erst mit BD-Konstrukten sowie Cotransformation). Die Interaktionen innerhalb der Gruppe der humanen α -Untereinheiten wurden vom Kooperationspartner untersucht. Die Mehrzahl der Bindungen konnten sowohl anhand des prototrophen Wachstums als auch mittels β -Galactosidase-Test (*colony-lift filter assay*) nachgewiesen werden (symbolisiert durch '+' bzw. '++' bei sehr starker Interaktion, gekennzeichnet durch intensive Blaufärbung der Kolonien). Oftmals konnte die Bindung auch in der reziproken Kombination beider Partner (AD_X + BD_Y verglichen mit AD_Y + BD_X) bestätigt werden (rot unterlegtes Feld).

Kurz vor Abschluß der umfangreichen Experimente im Rahmen dieser *Interaction Trap*- Studie wurden durch Jayarapu und Griffin Protein-Protein-Interaktionen zwischen einzelnen humanen 20S-Proteasom-Untereinheiten einschließlich POMP (syn.: Proteasassemblin) publiziert, die ebenfalls auf einem Hefe 2-Hybrid-Assay beruhten (Jayarapu and Griffin, 2004). In Abbildung 42 (Anhang) sind die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse allen bisher publizierten Interaktionen zwischen proteasomalen Untereinheiten verschiedener Spezies (human, *C.elegans* und *S.cerevisiae*) gegenüber gestellt (Cagney, et al., 2001; Davy, et al., 2001; Jayarapu and Griffin, 2004). Diese Gegenüberstellung zeigt für eine Vielzahl der beschriebenen Interaktionen eine Konservierung über die Speziesgrenzen hinweg auf, was in Anbetracht der hohen Homologien zwischen den α - bzw. β -Untereinheiten, vorallem in der räumlichen Struktur, auch nahe liegt (Groll, et al., 1997; Unno, et al., 2002). Die durch Jayarapu und Griffin vorgelegte Studie bestätigte die in der vorgelegten Arbeit beschriebene Transaktivierungsaktivität der humanen BD-Fusionsproteine von $\alpha 5$ und $\beta 1i$. Zusätzlich dazu wurden BD_POMP (syn.: Proteasassemblin) und BD_ $\beta 1$ als transaktivierend beschrieben. Teilweise konnte diese Transaktivierungsaktivität unter Erhöhung der Stringenz durch Zugabe des kompetitiven Inhibitors der Histidinsynthese 3-Aminotriazol eliminiert werden, was in einer Reduktion des 'Hintergrundwachstums' resultierte (Jayarapu and Griffin, 2004).

Auffällig ist, dass Interaktionen vornehmlich zwischen einzelnen β -Untereinheiten bzw. zwischen β -Untereinheiten und POMP nachzuweisen waren. Bindungen zwischen humanen α - und β -Untereinheiten waren hingegen selten. Die meisten Interaktionen zwischen einzelnen 20S-Komponenten wurden zwischen Untereinheiten nachgewiesen, die im reifen 20S-Proteasom in den einzelnen Heptamerringen benachbart liegen (z.B. $\alpha 6$ - $\alpha 7$ oder $\beta 2$ - $\beta 3$, alle derartigen Paarungen sind in Abbildung 42 [Anhang] gelb hinterlegt). Einige der hier beschriebenen

Interaktionen innerhalb der humanen 20S-Heptamerringe wurden durch die Publikation von Jayarapu und Griffin nicht gestützt. So wurden dort weniger β - β -Interaktionen beobachtet, manche allerdings trafen für die Hefe-Homologe wiederum zu, z.B. die Paarungen β 1- β 2 oder β 4- β 5 (Cagney, et al., 2001). Sog. Interringkontakte zwischen Untereinheiten, die in aneinandergrenzenden Heptamerringen lokalisiert sind, waren selten (in Abbildung 42 grau hinterlegt). Die nachgewiesene Interaktion zwischen β 3- β 5, die den Kontakt zwischen den beiden zentralen β -Heptamerringen unterstützen könnte, wird auch durch andere Publikationen gestützt (Cagney, et al., 2001; Jayarapu and Griffin, 2004). Dieser Kontakt zu β 3 deutete sich auch für die Immunounereinheit β 5i (LMP7) an, was jedoch durch andere, bereits publizierte Experimente nicht bestätigt wurde (Jayarapu and Griffin, 2004).

BD \ AD	β 1	β 2	β 3	β 4	β 5	β 6	β 7	β 1i	β 2i	β 5i	POMP	α 1	α 2	α 3	α 4	α 5	α 6	α 7
β 1		+	+		+		+			+	++							
β 2	+		++															
β 3		++	(+)		(+)		(+)		++	(+)	(+)							
β 4			(+)		(+)		+		(+)	+	+							
β 5	(+)		+	+		(+)	+				+			(+)				
β 6			(+)				(+)			(+)	(+)						(+)	
β 7	+		(+)			+	+	(+)		+	(+)							
β 2i			+															
β 5i	+		+			+	+	+	+	+	+							
POMP	(+)	+	+		+	+	+	++	++	++	+			+	+			+
α 1		(+)						(+)	+		(+)							+
α 2		(+)							(+)						+			+
α 3									(+)									+
α 4																		+
α 6						(+)				+								+
α 7								+									+	+

Abbildung 12: Protein-Protein-Interaktionen zwischen humanen 20S-Proteasom-Untereinheiten einschließlich POMP im vereinfachten Hefe 2-Hybrid-Assay (Interaction Trap) basierend auf der Coexpression zweier bekannter Fusionsproteine (mit N-terminaler GAL4_AD- bzw. GAL4_BD). Wurde eine Bindung nur aufgrund des prototrophen Wachstums konstatiert ohne Bestätigung mittels β -Galactosidase-Nachweis, ist sie durch '(+)' gekennzeichnet. Eine auch im X-Gal-Filterassay belegte Interaktion wird symbolisiert durch '+' bzw. durch '++' (bei starker Bindung, charakterisiert durch intensive Blaufärbung der Kolonien). Wurde in der reziproken Kombination (AD_ProteinX + BD_ProteinY im Vergleich zu AD_ProteinY + BD_ProteinX) ebenfalls eine Interaktion beobachtet, ist das entsprechende Feld rot hinterlegt. Eine Interaktion eines Proteins mit sich selbst ist durch eine graue Hinterlegung symbolisiert. Die Experimente zu α - α -Bindungen wurden vom Kooperationspartner durchgeführt (Apcher, et al., 2004).

Die Untereinheit $\beta 1$ grenzt an $\beta 7$ sowohl des eigenen β -Heptamerrings als auch an $\beta 7$ des benachbarten β -Rings. Somit könnte die in beiden humanen Studien beobachtete $\beta 1$ - $\beta 7$ Interaktion sowohl als Intra- als auch als Interringstabilisierung dienen [eigene Daten und (Jayarapu and Griffin, 2004)]. Auch Interaktionen zwischen zwei Untereinheiten, die im Komplex die α - β -Interringkontakte unterstützen könnten, waren relativ selten. Die Interaktion zwischen $\alpha 2$ und $\beta 2$ wurde sowohl bei der konstitutiven ($\beta 2$) als auch bei der Immununtereinheit ($\beta 2i$) beobachtet. Diese beiden Untereinheiten gingen auch eine Bindung zur humanen $\alpha 1$ -Komponente ein, was durch die Publikation von Jayarapu und Griffin bekräftigt wurde.

In allen Publikationen zu *Interaction Trap*-Bindungen wurden überraschenderweise auch Interaktionen von einzelnen Untereinheiten beobachtet, die in der räumlichen Struktur des reifen 20S-Proteasoms nicht aneinandergrenzen. Allerdings wurde diskutiert, dass auch ohne direktes Aneinandergrenzen dieser Untereinheiten im 20S-Komplex zumindest partielle Kontakte über N-terminale Ausläufer oder andere exponierte Domänen ausgebildet werden könnten. Die unerwartete Bindung zwischen $\alpha 2$ und $\alpha 4$ wurde u.a. auch für andere Homologe mehrfach bestätigt (Apcher, et al., 2004; Davy, et al., 2001; Jayarapu and Griffin, 2004). Beide humanen Hefe 2-Hybrid-Studien konstatieren eine weitere, nicht anhand der räumlichen Struktur des 20S Komplexes erklärbare Interaktion zwischen $\alpha 4$ und $\alpha 7$, die von Apcher *et al* auch durch *in vitro* Bindungsstudien bestätigt und weiter charakterisiert wurde.

Der Proteasom-Maturierungsfaktor POMP (syn. Proteasassemblin bzw. *S.cerevisiae* Ump1) wurde ebenfalls auf eine Interaktion mit singulären 20S-Komponenten untersucht. Das Hefehomolog Ump1 interagiert im Hefe 2-Hybrid nur mit $\alpha 1$ und $\beta 5$ (Cagney, et al., 2001). Die Studie mit humanen 20S-Untereinheiten von Jayarapu und Griffin beschreibt eine Assoziation von Proteasassemblin ausschließlich mit β -Untereinheiten: $\beta 1$, $\beta 1i$, $\beta 5$, $\beta 6$ und $\beta 7$. Wie Abbildung 12 aufzeigt, wurden in dem hier durchgeführten Experiment erheblich mehr Bindungen zu POMP eingegangen. Obwohl die Einzeltransformante von BD_POMP kein prototrophes Wachstum zeigte, kann eine geringe Transaktivierungsaktivität dieses Konstruktes dennoch nicht ausgeschlossen werden, da zwar die Vielzahl der gewachsenen Doppeltransformanten auf Interaktionsselektionsmedium zahlreiche Interaktionen indizierte, diese aber durch das nachgeschaltete Filterassay nicht bestätigt werden konnten. In dem durch Jayarapu und Griffin publizierten, analogen Experiment war das BD-Fusionsprotein von POMP / Proteasassemblin transaktivierend. Deswegen können alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen POMP-Bindungspartner nur dann als gesichert angesehen werden, wenn sie auch in der reziproken Kombination als positiv eingeschätzt wurden (s. Abbildung 12, rot hinterlegte Felder). POMP interagierte demnach gesichert mit $\beta 1$, $\beta 5$ sowie $\beta 5i$ und möglicherweise mit $\beta 3$, $\beta 6$ bzw. $\beta 7$. Die Bindung von POMP / Proteasassemblin an $\beta 1$ bzw. $\beta 5$ wurde ebenfalls durch Jayarapu und Griffin beschrieben, nicht jedoch die an die Immununtereinheit $\beta 5i$ / LMP7. Wie Abbildung 13A zeigt, interagierte POMP sowohl mit $\beta 5$ (MB1) als auch mit $\beta 5i$ (LMP7).

3.1.2 *in vitro*-Nachweis der Interaktion zwischen POMP und den humanen β 5-Homologen

Jayarapu und Griffin (2004) wiesen eine Interaktion von POMP / Proteasassemblin mit humanem β 5 (MB1), nicht aber mit der homologen Immununtereinheit β 5i (LMP7) nach. Deshalb stellten sie die These auf, dass hinsichtlich der Interaktion des Maturierungsfaktors mit den β 5-Homologen ein Unterschied in der Assemblierung von humanen konstitutiven und Immunoproteasomen liegen könnte. Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, wies das Hefe 2-Hybrid-Experiment jedoch darauf hin, dass POMP mit beiden β 5-Homologen interagiert. Um diese Interaktionen weiter zu charakterisieren, wurden *in vitro*-Bindungsstudien von humanem POMP mit verschiedenen β -Untereinheiten und deren Chimären durchgeführt. Hierfür wurde entweder POMP mit diversen N-terminal His₆-fusionierten β -Untereinheiten bzw. His₆-POMP mit verschiedenen β -Untereinheiten unter Zugabe von ³⁵S-Methionin im Retikulozytenlysatsat *in vitro* coexprimiert (s. 2.12.1.2) und in einem anschließenden *Pull Down*-Assay mit magnetischer NiNTA-Agarose unter nativen Bedingungen copräzipitiert. Diese Experimente wurden unter sehr stringenten Waschbedingungen (erhöhte Salz- und Detergenz-Konzentrationen) durchgeführt, um unspezifische Bindungen zu unterbinden (s. 2.12.2.2). Wie das zugehörigen Autoradiogramm (Abbildung 13B, 1 und 2) zeigt, wurde die Bindung des Proteasom-Maturierungsfaktors His₆-POMP sowohl an die Immununtereinheit β 5i (LMP7, Proform) als auch an die korrespondierende konstitutive Untereinheit β 5 (MB1, Proform) nachgewiesen. Im reziproken Experiment copräzipitierten die His₆-Fusionsproteine der β 5-Homologen den Maturierungsfaktor ebenfalls (Abbildung 13C, 1 und 4).

Da das POMP-Homologe Ump1 in Hefe in genetischen Studien funktionell mit der Proform von β 5 assoziiert vorlag (Ramos, et al., 1998), wurde untersucht, ob die Bindungsstellen von POMP in den entsprechenden Propetiden der humanen β 5-Homologe lokalisiert sind. Dazu wurden Bindungsstudien mit Chimären aus den entsprechenden humanen Propetiden und der β -Untereinheit des Archaeons *Archaeoglobus fulgidus* durchgeführt (schematische Darstellung s. Abbildung 13B und C). Die β -Untereinheit von *A. fulgidus* und POMP interagierten nicht (Abbildung 13B, 3). Die chimären Fusionsproteine His₆_proLMP7_AF β bzw. His₆_proMB1_AF β copräzipitierten jedoch POMP (Abbildung 13C, 3 und 6), was auf eine Interaktion von POMP mit entsprechenden Bindungsstellen in den Propeptiden von β 5 / MB1 und β 5i / LMP7 hinweist. Allerdings wurde ebenfalls eine Copräzipitation von POMP mit den um die Propeptide tranktierten, also 'reifen' LMP7- bzw. MB1-Proteinen (His₆_ΔproLMP7 bzw. His₆_ΔproMB1) nachgewiesen (Abbildung 13C, 2 und 5). Die Interaktion zwischen POMP und β 5i / LMP7 bzw. β 5 / MB1 könnte somit über multiple Proteinbindungsstellen vermittelt werden, die sowohl im Propeptid, als auch im reifen Protein lokalisiert liegen. Sowohl die Proform, als auch das 'reife' LMP7-Protein schien im Vergleich zu den jeweiligen MB1-Formen quantitativ mehr POMP binden zu können. Diese Tendenz wurde auch durch die intensivere Blaufärbung der Cotransformanten von LMP7 und

POMP im Vergleich zu den MB1 + POMP-Transformanten im β -Galactosidase-Nachweis des *Interaction Trap*-Experimentes angezeigt (Abbildung 13A). Somit konnte erstmals eine spezifische Interaktion zwischen Pomp und der Immununtereinheit β 5i/LMP7 sowohl *in vivo* (s. 3.1.1) als auch *in vitro* nachgewiesen werden.

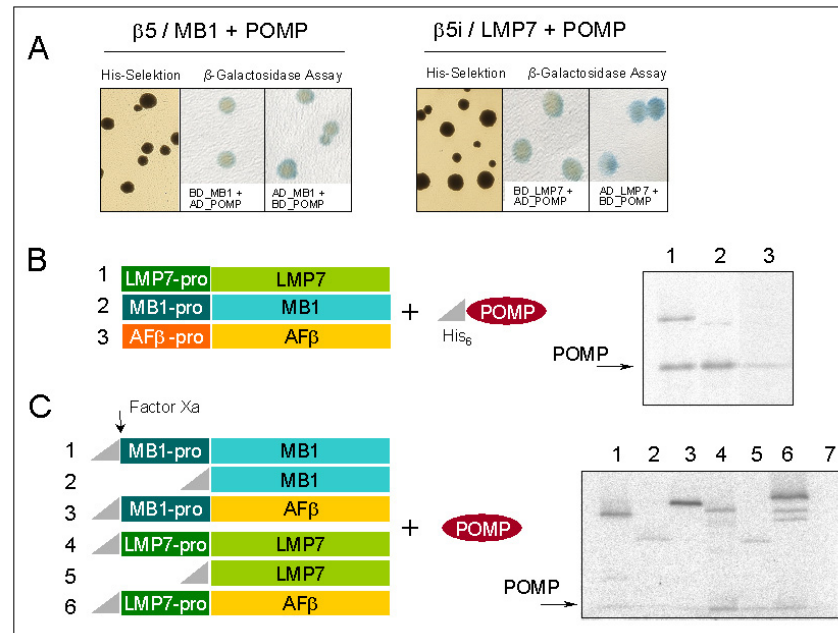


Abbildung 13: *in vivo*- und *in vitro*-Bindungsstudien zwischen POMP und humanen β 5-Untereinheiten bzw. deren Chimären (s. schematische Darstellung) **A**: *Interaction Trap*-Analyse (vereinfachtes Hefe 2-Hybrid) der Bindung von POMP an β 5/MB1 und β 5i/LMP7, nachgewiesen über das prototrophe Wachstum und ein sog. Filterassay zum Nachweis von β -Galactosidase. **B**: His₆-POMP wurde unter Zugabe von ³⁵S-Methionin im Retikulozytenlysat mit den Proformen von humanem β 5i/LMP7 (1), β 5/MB1 (2) bzw. der β -Untereinheit von *Archaeoglobus fulgidus* (AF β , 3) coexprimiert. Der Interaktionsnachweis erfolgte mittels magnetischen NiNTA-Agarose *Beads* unter nativen Bedingungen. Die präzipitierten Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt sowie autoradiographisch nachgewiesen. His₆-POMP interagiert mit beiden humanen β 5-Homologen (1, 2), aber nicht mit der archaeobakteriellen β -Untereinheit (3). **C**: Reziproker Interaktionstest von POMP mit verschiedenen N-terminal His₆-fusionierten β -Untereinheiten: Proformen von MB1 (β 5, 1) bzw. LMP7 (β 5i, 4), Prosequenz-deletierte Proteine (His₆- Δ proMB1 [2] bzw. His₆- Δ proLMP7 [5]) sowie die Chimären der jeweiligen Propeptide fusioniert an die 'reife' AF β -Untereinheit (His₆-pMB1_AF β [3] bzw. His₆-pLMP7_AF β [6]). Die Proteine (mit assoziiertem POMP) wurden durch Behandlung mit Faktor Xa von der NiNTA-Agarose proteolytisch abgespalten. POMP bindet allein nicht an die NiNTA-Agarose (Spur 7, Negativkontrolle).

3.1.3 Indizien für frühe humane 20S-Assemblierungsintermediate in Dichtegradienten

Geht man davon aus, dass die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Interaktionen zwischen einzelnen humanen 20S-Komponenten nicht durch putative Hefe-endogene „Brückenproteine“ vermittelt wurden, sind diese theoretisch Bindungen zwischen zwei singulären Proteinen. *In vivo* muß jedoch von einer ungleich größeren Komplexität ausgegangen werden, da zumindest bezüglich der früh in proteasomale Assemblierungsintermediate inkorporierten Untereinheiten (s. Kapitel 1.5.2.2 und 1.5.3) eine Mischung aller Proteine schon zum Zeitpunkt der Initiation der

Komplexformation in der Zelle vorliegt. Unter Umständen könnten dabei sogar bestimmte Interaktionen, die per *Interaction Trap* konstatiert wurden, durch einen anderen, womöglich bevorzugten Interaktionspartner, im Oligomerkomplex sterisch inhibiert werden. Für die humane Assemblierung sind bisher keine frühen Assemblierungsintermediate beschrieben, die kleiner sind als die 13S-Precursorkomplexe von ca. 300kDa Größe (s. Kapitel 1.5.3). Deshalb wurde eine Charakterisierung kleinerer Assemblierungsintermediate im Rahmen dieser Arbeit angestrebt. Dass solche kleinen Komplexe existieren, zeigte die Analyse der Verteilung aller humaner 20S-Komponenten in Dichtegradientenfractionen.

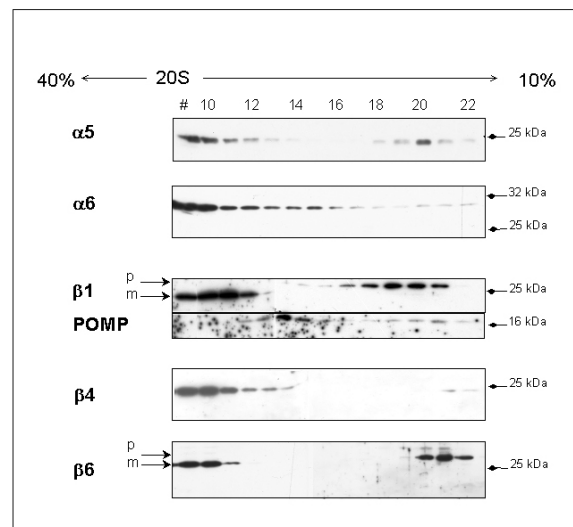


Abbildung 14: Verteilung ausgesuchter humaner 20S-Untereinheiten und POMP in Dichtegradienten-Fractionen. Proteinlysate von HeLa- (bez. α5, α6, β4, β6) bzw. T2-Zellen (bez. β1, POMP) wurden einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (10-40%) unterzogen, der Gradient beginnend bei 40% Saccharose (#1) bis zu 10% Saccharose (#24) fraktioniert und humane 20S-Komponenten per Immunoblot in den Fraktionen nachgewiesen. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Gradienten von Fraktionen geringerer Dichte bis zu Fraktionen # 9-11, in denen das 20S-Proteasom hauptsächlich sedimentiert, wie mittels Proteaseassay mit fluorogenen Substraten nachgewiesen wurde.

Das Lysat von humanen T2- bzw. HeLa-Zellen wurde in einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt, in 500µl-Fractionen unterteilt und diese mittels Immunoblot auf alle humanen 20S Untereinheiten, einschließlich POMP, getestet. Dabei konnten in den Fraktionen geringerer Dichte einzelne 20S-Komponenten nachgewiesen werden. Abbildung 14 zeigt eine solche Verteilungsanalyse exemplarisch an den Untereinheiten α5, α6, β1, β4, β6 sowie POMP in den Prä-20S-Fractionen (# 9-22) eines 40-10%igen Saccharose-Dichtegradienten auf. Die Sedimentation von allen humanen 20S-Komponenten im Dichtegradienten ist in Abbildung 15 schematisch zusammengefaßt. Diese Verteilung scheint nicht zelltypspezifisch zu sein. Die Gradienten der zwei hier getesteten Zelllinien HeLa und T2 wiesen grundsätzlich gleiche Muster auf, die wiederum der Sedimentation der α-Untereinheiten in Gradienten der ebenfalls humanen Zelllinie HEK 293 entsprachen (Apcher, et al., 2004).

Geringfügige Unterschiede bestanden nur in der Intensität der Signale für einzelne Komponenten, so z.B. für das Maturierungsprotein POMP. In HeLa-Zellen wurde prinzipiell eine geringere POMP-Menge detektiert als in T2-Zellen. Auf den unterschiedlichen Gehalt von POMP in verschiedenen Zellsaten wird in den folgenden Kapiteln ausführlicher eingegangen. Auffallend ist, dass einige Untereinheiten (wie z.B. $\alpha 2$ und $\beta 7$) ausschließlich in den Fraktionen des reifen 20S-Proteasoms zu detektieren waren. Assemblierungsintermediate, die diese Untereinheiten enthalten, scheinen demnach wesentlich kurzlebiger zu sein, als andere Komplexe. Andere Komponenten wie $\alpha 3$, $\alpha 5$ pro- $\beta 1$, $\beta 4$ oder $\beta 6$ sedimentierten jedoch, neben den 20S- und 13/16S-Precursor-Fraktionen, auch in Fraktionen der frühen Assemblierungsintermediate.

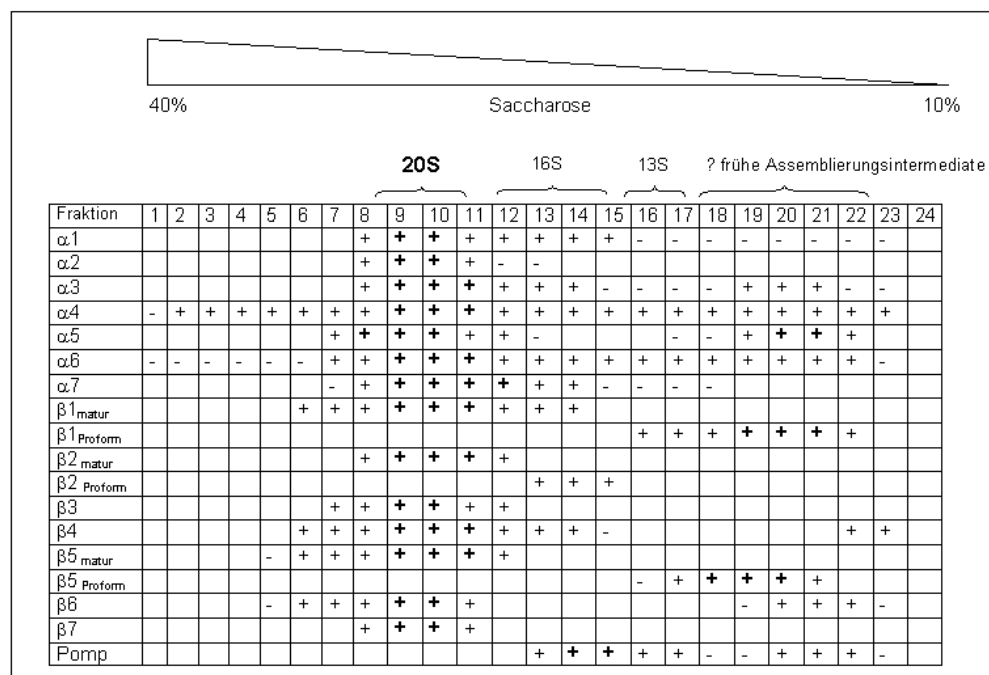


Abbildung 15: Verteilung aller humaner 20S-Untereinheiten und POMP in Dichtegradienten-Fractionen von Proteinlysate humaner HeLa- bzw. T2-Zellen, analysiert mittels Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen proteasomale α - und β -Untereinheiten sowie POMP. Der Gradient wurde beginnend bei 40% Saccharose (von unten) fraktioniert. Der reife und damit aktive 20S-Partikel sedimentiert hauptsächlich in den Fraktionen 9 bis 11, wie anhand eines Proteaseassays mit fluorogenen Peptiden nachgewiesen wurde. Die ungefähre Sedimentation von proteasomalen Precursorkomplexen (13S bzw. 16S) sowie von putativen frühen Assemblierungsintermediaten ist anhand ihrer Untereinheiten-Komposition bzw. ihrer Größenabschätzung angegeben. Ist eine Untereinheit deutlich im Immunoblot nachzuweisen, ist dies mit '+' gekennzeichnet, die Hauptfraktionen sind mit '+' symbolisiert. Eine schwache Existenz ist durch '-' gekennzeichnet. Da die spezifischen Antikörper gegen $\beta 1$ (δ), $\beta 2$ (Z) und $\beta 5$ (MB1) auch die entsprechenden Proformen mit größerem Molekulargewichten erkennen, sind diese in der Tabelle aufgeführt.

Ob Komponenten, die in gleichen Fraktionen angereichert wurden, auch wirklich komplexiert vorlagen, sollte mittels Co-Immunpräzipitation aus den Gradientenfraktionen überprüft werden.

So konnten z.B. aus 13/16S-Precursorfraktionen erfolgreich Komplexe mit $\alpha 7$ -spezifischen Antikörpern präzipitiert werden, die POMP enthielten. Auch putative frühe Assemblierungsintermediate konnten immunpräzipitiert werden. So präzipitierten spezifische Antikörper gegen $\alpha 4$, $\alpha 5$ bzw. $\alpha 6$ Komplexe, die pro- $\beta 1$ enthielten. Wie Apcher *et al* zeigten, co-immunpräzipitierte dieser $\alpha 4$ -Antikörper auch frühe Assemblierungsintermediate von ca. 4 bis 9S aus Dichtegradienten von HEK 293-Zellen, die $\alpha 7$ enthalten (Apcher, et al., 2004).

3.1.4 Frühe humane 20S-Assemblierungsintermediate

Die durch parallele Sedimentation im Dichtegradienten indizierten frühen humanen Assemblierungsintermediate sollten biochemisch aufgereinigt werden. Dazu wurde das Aufreinigungsschema für humane 20S-Proteasomen dahingehend modifiziert, dass neben Precursorkomplexen und 20S-Proteasomen auch frühe Assemblierungsintermediate (*early proteasome intermediates*, 'EPIs'), aus T2-Zellen angereichert wurden (s. Kapitel 2.12.2.5). Diese frühen Intermediate zeichneten sich durch eine geringere Dichte als 20S-Proteasomen bzw. 13/16S-Precursorkomplexe im Saccharosegradienten aus sowie durch die Inkorporation des Maturierungsproteins POMP bzw. von Proformen proteasomaler β -Untereinheiten. Mittels zweifacher Chromatographie (ÄKTA-FPLC) aufgereinigte 'EPIs' wurden per SDS-PAGE und Coomassiefärbung visualisiert (Abbildung 16A) bzw. ihre Zusammensetzung mittels Immunoblots gegen alle 20S-Proteasom-Komponenten analysiert. Dabei wurden folgende 20S-Untereinheiten detektiert: $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, (pro-) $\beta 1$, (pro-) $\beta 5$, (pro-) $\beta 6$ sowie POMP. Ausgewählte Immunoblots dieser Analysen sind in Abbildung 16B dargestellt.

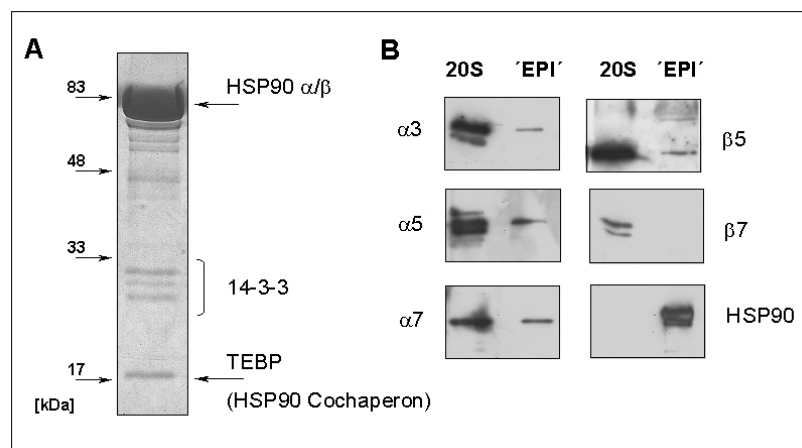


Abbildung 16: Putative frühe Proteasom-Assemblierungsintermediate (*early proteasome intermediates*, 'EPIs') enthalten HSP90 und 14-3-3-Proteine. Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der isolierten Komplexe (A), angegeben ist ein Proteinstandard (in kDa) und die durch Peptidmassen-Fingerprint-Analyse und MS/MS-Auswertung identifizierte Komponenten HSP90, 14-3-3 und TEBP. Per Immunoblot wurden alle proteasomalen Untereinheiten auf ihre Existenz in den frühen Assemblierungsintermediaten ['EPIs'] untersucht (B zeigt eine Auswahl), als Kontrolle diente parallel gereinigtes 20S-Proteasom [20S].

Die sehr dominante hochmolekulare Bande im gefärbten Gel wurde durch einen Immunoblot mit einem HSP90-spezifischen Antikörper als dieses Chaperon charakterisiert. Eine Peptidmassen-Fingerprint-Analyse und anschließende MS/MS-Auswertung durch Frau Dr. K. Janek (s. Kapitel 2.12.3.6) identifizierte ebenfalls humanes HSP90 α/β mit einer ca. 40%igen Sequenzabdeckung. Als weitere Komponenten der putativen frühen Proteasom-Assemblierungsintermediate wurden mehrfach, mit bis zu 85%iger Sequenzabdeckung, weitere nicht-proteasomale Proteine identifiziert, wie das HSP90-Cochaperon TEBP und mehrere Mitglieder der Familie der allosterischen Cofaktoren der 14-3-3 Proteine (ϵ , γ , δ/ξ , θ , β/α , η).

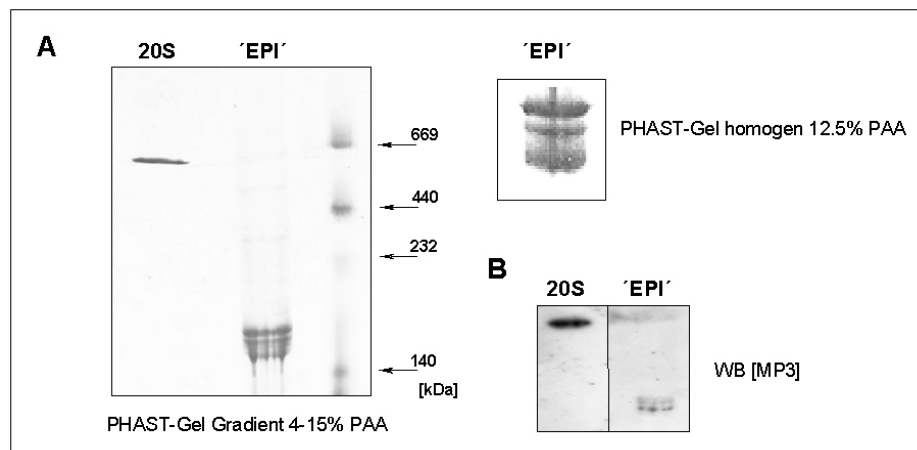


Abbildung 17: Die isolierten putativen frühen Proteasom-Assemblierungsintermediate ('EPIs') bestehen aus drei Subkomplexen. Eine native PAGE (A: PAA Gradient 4-15%, links bzw. homogenes 12.5% Gel, rechts) der isolierten frühen Assemblierungsintermediate zeigte auf, dass diese aus drei Subkomplexen einer Größe zwischen 140 und 232 kDa bestehen. Als Kontrolle diente parallel gereinigtes 20S. Im Immunoblot werden sowohl reines 20S-Proteasom als auch die Subkomplexe der 'EPIs' vom 20S-Proteasom-spezifischen Antikörper MP3 erkannt (B).

Alle Proteinbanden, die im Coomassie-gefärbten Gel aufgrund ihrer Größe als mögliche proteasomale Untereinheiten eingeschätzt wurden, gehörten laut Proteinidentifizierung der 14-3-3-Proteinfamilie an. Um zu prüfen, ob die im Immunoblot detektierten proteasomalen Untereinheiten wirklich mit den allosterischen Cofaktoren bzw. mit dem Chaperon HSP90 komplexiert vorliegen oder ob möglicherweise doch keine reinen Komplexe isoliert werden konnten, wurden Coimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Verschiedene Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern gegen 20S-Proteasomen (MP3, s. Tabelle 7), gegen proteasomale Precursorkomplexe [C8, (Nandi, et al., 1997)] oder gegen den Maturierungsfaktor POMP (Witt, et al., 2000) konnten sowohl u.a. $\alpha 4$, $\alpha 5$ und HSP90 copräzipitieren. Dies belegte eine Komplexierung dieser Proteine in den aufgereinigten, putativen frühen Assemblierungsintermediaten. Die 'EPI'-Komplexe mehrerer unabhängiger Präparationen wurden mittels nativer PAGE analysiert. Dabei wurden sie in drei distinkte Subkomplexe einer Größe zwischen 140 und 232kDa aufgetrennt (Abbildung 17A). In einer Immunoblot-Analyse mit

20S-Proteasom-spezifischen Antikörpern (MP3) wurden alle drei durch die native PAGE aufgetrennten Banden detektiert (Abbildung 17B). Somit kann davon ausgegangen werden, dass drei in ihrer Größe sehr ähnliche Subkomplexe von frühen Precursorkomplexen, mit u.U. verschiedenen Anteilen an proteasomalen Untereinheiten, Chaperonen und allosterischen Cofaktoren der 14-3-3-Proteinfamilie, isoliert werden konnten. In diesen Subkomplexen liegen proteasomale Untereinheiten bzw. HSP90 und 14-3-3-Proteine in nicht stöchiometrischen Verhältnissen vor. Die genauere biochemische Charakterisierung der Subkomplexe konnte im Rahmen der vorgelegten Arbeit nicht abgeschlossen werden und bleibt weiterhin Gegenstand der Forschung der Arbeitsgruppe.

3.2 Späte Ereignisse der eukaryotischen 20S-Proteasom-Assemblierung und Maturierung

3.2.1 Der humane Proteasom-Maturierungsfaktor POMP

POMP (syn.: hUmp1 / Proteasasemblerin) ist eine Komponente von proteasomalen Precursorkomplexen und ist als akzessorisches Protein der humanen 20S-Proteasom-Assemblierung beschrieben [s. Kapitel 1.5.6 (Burri, et al., 2000; Griffin, et al., 2000)]. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, dass die POMP-mRNA in humanen Zellen nach einem IFN γ - Stimulus induziert wird (Burri, et al., 2000; Witt, et al., 2000), was eine Bedeutung dieses Proteins auch für die Immunoproteasom-Maturierung nahe legte.

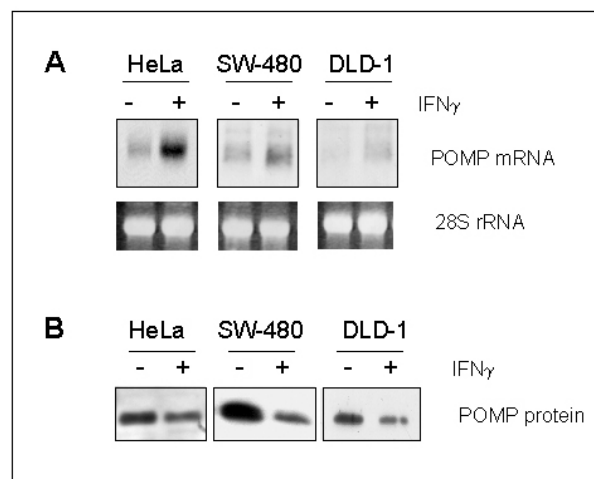


Abbildung 18: Die erhöhte POMP mRNA Expression nach IFN γ -Stimulation resultiert nicht in einem Zuwachs des Proteasom-Maturierungsproteins POMP in ausgewählten humanen Zelllinien. Chemilumino-gramm eines Northern Blots (A) bezüglich der POMP mRNA Expression in Zervixcarcinom- (HeLa) bzw. Coloncarcinom-Zellen (SW-480, DLD-1) in Abhängigkeit von deren Cytokin-Stimulation [- / + IFN γ]. Als interner Standard dienten die Ethidiumbromid-gefärbten Banden der 28S rRNA im Agarosegel. Der POMP-Gehalt in den korrespondierenden Gesamtproteinlysaten (je 50 μ g) wurde mittels *Western Blot* analysiert (B).

Die Induktion der POMP-mRNA durch $\text{IFN}\gamma$ konnte für verschiedene humane Zelllinien (Zervixcarcinom-Zellen HeLa sowie Colonicarcinom-Zellen SW-480 und DLD-1) anhand von *Northern Blot*-Experimenten mit POMP-spezifischen Sonden bestätigt werden (Abbildung 18A). Im Gegensatz dazu resultierte die Cytokin-Stimulation nicht in einem Nachweis auch induzierter POMP-Mengen auf Proteinebene (Abbildung 18 B). In den *Western Blot*-Analysen wurde gegenteilig sogar oftmals weniger POMP in $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten Zellen detektiert als in den unbehandelten Kontrollzellen. Das Cytokin induzierte z.B. in SW-480-Zellen die POMP-mRNA signifikant, verursachte aber eine drastische Reduktion des POMP-Proteinexpressionsniveaus.

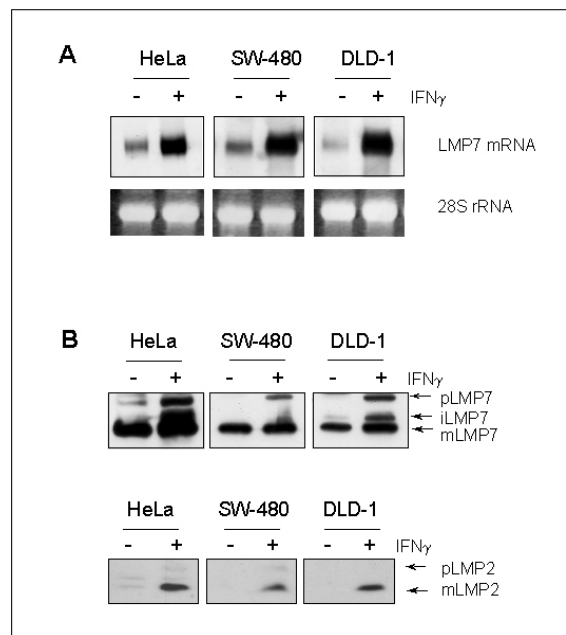


Abbildung 19: $\text{IFN}\gamma$ induziert die Immununtereinheiten LMP2 ($\beta 1i$) und LMP7 ($\beta 5i$) sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. (A) Chemiluminogramm einer Northern Blot Analyse bezüglich LMP7-mRNA in Gesamt-RNA-Isolaten humaner Zelllinien in Abhängigkeit vom Cytokin-Stimulus (150U/ml $\text{IFN}\gamma$ 24h [+]). Als interner Standard dienten die Ethidiumbromid-gefärbten Banden der 28S rRNA im Agarosegel. Anhand von Western Blot Analysen (B) wurden in den korrespondierenden Gesamtproteinlysaten LMP2- bzw. LMP7-Proteine nachgewiesen. Die maturierte, in 20S-Proteasomen inkorporierte Form der Proteine ist mit mLMP2 bzw. mLMP7, die Proformen entsprechend 'p' (vollständiges Propeptid) bzw. 'i' (partiell verkürzte Intermediärform der Proform) bezeichnet.

Diese Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinexpression von POMP ist entweder mit einer verringerten Translationseffizienz der mRNA oder mit einer geringeren Stabilität des Proteins unter dem Einfluß des Cytokins zu erklären. Dass zumindest generell die Expression cytokin-induzierter Transkripte in den ausgewählten Zellen nicht gestört ist, lieferte die Analyse weiterer $\text{IFN}\gamma$ -induzierter Proteasom-Komponenten, wie von den Immununtereinheiten LMP2 ($\beta 1i$) und LMP7 ($\beta 5i$). Beide Untereinheiten wurden in $\text{IFN}\gamma$ -exponierten Zellen sowohl als Transkript (Abbildung 19 A, exemplarisch LMP7-mRNA), als auch als Protein (Abbildung 19 B) signifikant

induziert. Dieses Ergebnis schloss eine generelle Beeinträchtigung der Translationseffizienz IFN γ -induzierter Transkripte aus. Somit erschien wahrscheinlich, dass auch POMP zwar auf Proteinebene verstärkt exprimiert werden, aber so schnell degradiert werden könnte, dass es im Immunoblot auf Gesamtlysat nicht nachgewiesen werden konnte.

3.2.2 Die POMP-Stabilität ist ein Marker für die Kinetik der Maturierung humaner 20S-Proteasomen

Um zu überprüfen, ob der Maturierungsfaktor POMP in IFN γ -stimulierten Zellen einem schnelleren Abbau unterliegt, wurden die Proteine humaner HeLa-Zellen metabolisch ^{35}S -markiert und *Pulse-Chase* Experimente durchgeführt (s. Kapitel 2.10.1). Dafür wurden die HeLa-Zellen vor der metabolischen ^{35}S -Methionin-Markierung einerseits 24h mit IFN γ stimuliert, andererseits im Vollmedium belassen. Somit war sichergestellt, dass die Zellen entweder nahezu ausschließlich konstitutive Proteasomen (-IFN γ) bzw. bevorzugt Immunoproteasomen (+IFN γ) exprimierten. Eine 24stündige Cytokin-Exposition war für eine nahezu ausschließliche Immunoproteasom-Formation in schnell wachsenden HeLa-Zellen ausreichend. Bereits 10 Stunden nach Beginn der IFN γ -Exposition war reifes Immunoproteasom nachzuweisen (s. Kapitel 3.2.8). Nach der metabolischen Gesamtprotein-Markierung mit ^{35}S -Methionin (*Pulse*) und gründlichem Waschen wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiträume (*Chase*) in Vollmedium weiter kultiviert und anschließend lysiert. Aus dem löslichen Gesamtproteinlysat wurden mittels spezifischen Antikörpern (MP3) Proteasomkomplexe immunpräzipitiert (s. Kapitel 2.12.2.3). Das Präzipitat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die proteasomalen Komponenten autoradiographisch visualisiert (s. Kapitel 2.12.3.4).

Abbildung 20 zeigt ein solches Autoradiogramm von Immunpräzipitaten eines *Pulse Chase*-Experimentes von HeLa-Zellen in Abhängigkeit von deren vorheriger Cytokinstimulation. Dass sich die Bandenmuster der präzipitierten Proteine aus Lysaten von unbehandelten und stimulierten Zellen unterscheiden, ist damit zu erklären, dass unterschiedliche Komplexe gefällt wurden. Bezüglich der unbehandelten (-IFN γ) HeLa-Zellen setzte sich das Präzipitat mehrheitlich aus reifen konstitutiven 20S-Proteasomen und konstitutiven Precursorkomplexen zusammen. Aus dem Lysat stimulierter HeLa-Zellen (+IFN γ) wurden hauptsächlich reife Immunoproteasomen und Immuno-Precursorkomplexe gefällt. Daraus resultierte ein Unterschied in sechs Proteinen für die drei aktiven β -Untereinheiten, da diese im Präzipitat sowohl als Pro- als auch als maturierte Form vorlagen. Im Verlauf der *chase*-Zeit war eine fortschreitende Maturierung der präzipitierten Komplexe am deutlichsten anhand der untersten Bande im Proteasommuster der stimulierten Zellen zu beobachten, die während des *chase*-Zeitraums an Intensität zunahm. Dieses Protein ist maturiertes LMP2 mit dem kleinsten Molekulargewicht aller humanen α - und β -Untereinheiten (Abbildung 20 A).

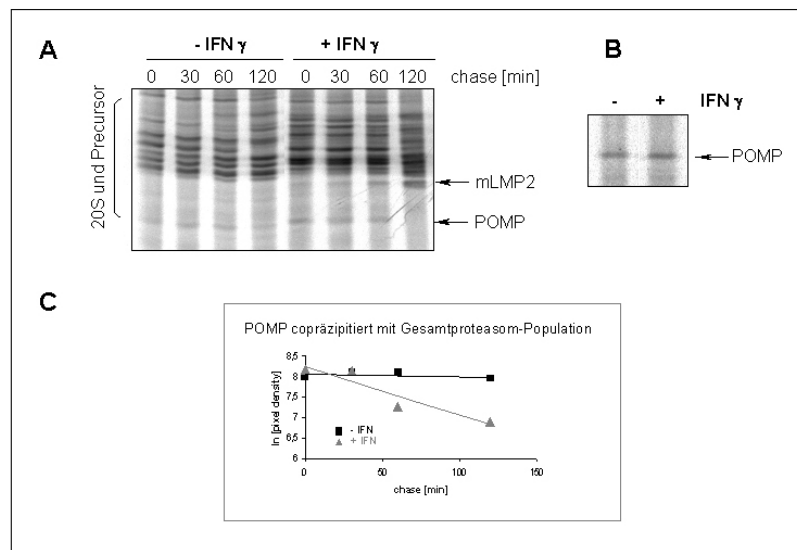


Abbildung 20: IFN γ induziert das Maturierungsprotein POMP, das in stimulierten HeLa-Zellen aber schneller degradiert wird. Vor der metabolischen ^{35}S -Gesamtprotein-Markierung (1h *Pulse*) wurden HeLa-Zellen zunächst in Ab- [-] bzw. Anwesenheit [+] von IFN γ sowie nach dem *Pulse* für verschiedene Zeiträume (*Chase*, bis zu 120min) in Vollmedium weiter kultiviert. Markierte proteasomale Komplexe (reifes 20S und Precursor) wurden mittels spezifischem anti-Proteasom-Antikörper (MP3) aus Gesamtproteinlysaten immunpräzipitiert. Nach der Auftrennung im SDS-PAGE wurden die Proteine autoradiographisch visualisiert (**A**). Direkt nach dem Pulse [*Chase* 0min] ist eine höhere Bandenintensität für POMP in stimulierten Zellen nachzuweisen (**B**), was einer Induktion des Maturierungsfaktors auf Proteinebene entspricht. Die Quantifizierung der POMP-Bandenintensitäten (**C**) zu den einzelnen Zeitpunkten ergab eine ca. 2.5fach schnellere Abbaurrate von POMP in induzierten Zellen.

Eine weitere Komponente, die mittels MP3-Immunpräzipitation zusammen mit reifen Proteasomen und Precursorkomplexen präzipitiert wurde, ist ein Protein von ca. 16kDa (Abbildung 20A). Die Bande entspricht dem Maturierungsfaktor POMP, was auch per Immunoblot mittels POMP-Antikörper (Witt, et al., 2000) auf Immunpräzipitat bestätigt wurde. Dieses *Pulse-Chase*-Experiment bestätigte erstmals eine erhöhte POMP-Synthese in den Zellen nach IFN γ -Stimulation (Abbildung 20B, Vergleich zum Zeitpunkt 0 ohne *Chase*). POMP wurde aber in stimulierten Zellen wesentlich schneller degradiert, als in den unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 20A). Dieses Ergebnis erklärt den fehlenden Nachweis einer induzierten POMP-Expression mittels Immunoblots auf Gesamtproteinlysaten (*steady-state*). Denn trotz verstärkter Synthese eines Proteins kann sich bei vorliegender hoher Degradationsrate das Gleichgewicht dieses Proteins auf so niedrigem Niveau einpegeln, dass im Gesamtlysate-Immunoblot eine scheinbar geringere Expression angezeigt wird.

Die Quantifizierung der POMP-Intensitäten (s. Kapitel 2.13.2) mehrerer unabhängiger Experimente ergab eine ca. 2.5fach beschleunigte Abbaurrate von POMP in IFN γ -stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 20C). Dieser Wert bezieht sich auf Experimente, in denen mit einem Proteasom-spezifischen Antikörper (MP3) die proteasomale Gesamtpopulation immunpräzipitiert wurde, also sowohl reifes 20S-Proteasom als auch

Precursorkomplexe. Wurden hingegen aus den ^{35}S -markierten Gesamtproteinlysaten ausschließlich Precursorkomplexe (mit integriertem POMP) mittels eines Precursor-spezifischen Antikörpers [C8, (Nandi, et al., 1997)] immunpräzipitiert, zeigte sich der Trend des schnelleren POMP-Abbaus noch eindeutiger (Abbildung 21A). Die Quantifizierung mehrerer unabhängiger Experimente ergab eine durchschnittlich vierfach höhere Abbaurate von POMP, integriert in Immunoproteasom-Precursorkomplexe, verglichen mit der von POMP in konstitutiven Precursorkomplexen (Abbildung 21B). Die Halbwertszeit von POMP in Precursorkomplexen wurde über die Anstiege der genäherten linearen Funktionen abgeschätzt (s. Kapitel 2.13.2). Die gemittelte Halbwertszeit von vier unabhängigen Experimenten (mit jeweiligen Doppelwerten) beträgt mehr als eine Stunde (82min) in nicht stimulierten und 21min in $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten HeLa-Zellen. Der Abbau von POMP ist direkt an die Komplettierung der Maturierung naszierender Proteasomen gebunden (s. Kapitel 1.5.6). Die nachfolgenden Experimente sollten zeigen, dass auch bezüglich der Reifung von Immunoproteasomen diese Kopplung besteht.

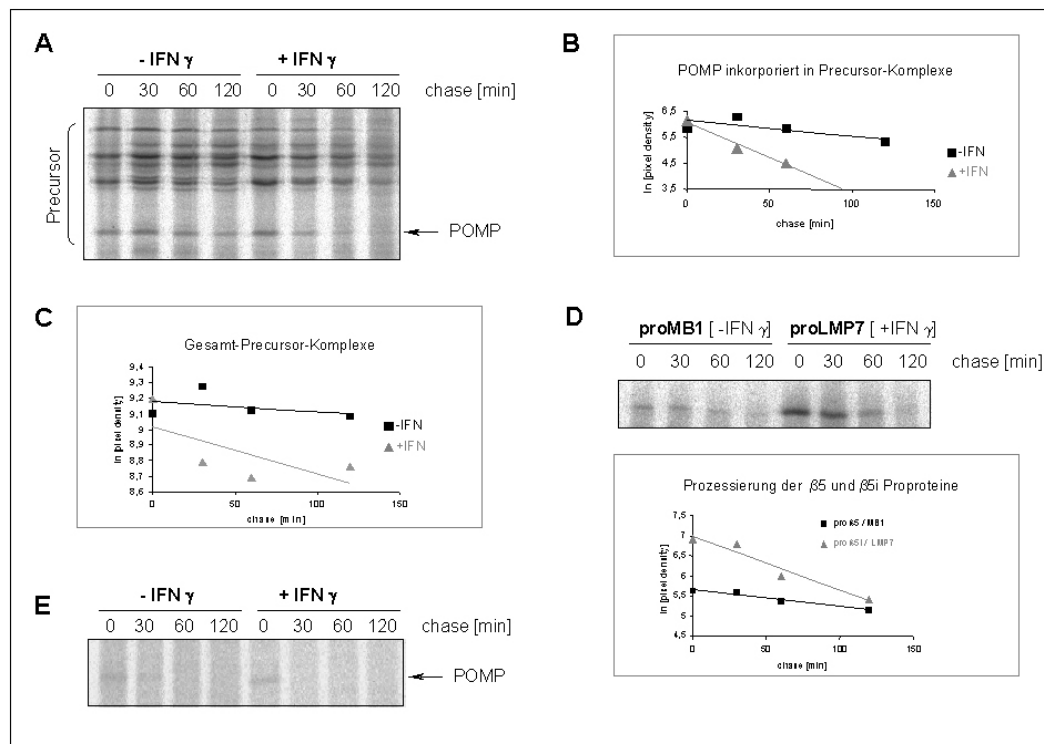


Abbildung 21: *Pulse Chase*-Experimente zur Bestimmung der Maturierungskinetik von konstitutiven [-IFN γ] und Immuno-Precursorkomplexen [+IFN γ]. Das *Pulse-Chase*-Experiment wurde analog zu dem in Abbildung 20 durchgeführt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit C8-Antikörpern, die spezifisch die Konformation von Precursorkomplexen mit inkorporiertem POMP erkennen. Die im Autoradiogramm (A) detektierten POMP-Banden wurden quantifiziert (B). POMP wird unter dem Einfluß von IFN γ ca. 4fach schneller degradiert. Auch die Quantifizierung der Bandenintensitäten der gesamten Precursorkomplexe (C) reflektiert eine ca. 5fach schnellere Maturierung der Immunokomplexe im Vergleich zu konstitutiven Precursorkomplexen. Eine spezifische Immunpräzipitation der $\beta 5$ -Homologe ($\beta 5$ /MB1 aus unstimulierten Zelllysaten [-IFN γ] bzw. $\beta 5i$ /LMP7 aus stimulierten Zelllysaten [+IFN γ]) erlaubte eine Quantifizierung der Proformen dieser Proteine (D). Pro- $\beta 5i$ /LMP7 wird in Immuno-Precursorkomplexen ca. dreifach schneller prozessiert als Pro- $\beta 5$ /MB1 in konstitutiven Precursorkomplexen. Die Immunpräzipitation mit spezifischem POMP-Antikörper (E) konnte aufgrund schwacher Bandenintensitäten nicht quantifiziert werden.

Die fortschreitende Maturierung eines proteasomalen Precursorkomplexes ist mit einer Konformationsänderung hin zum 20S-Proteasom verbunden (Groll, et al., 2003; Nandi, et al., 1997). Der C8-Antikörper erkennt konformationsabhängige Epitope der $\alpha 7$ -Untereinheit, die nur in Precursorkomplexen zugänglich sind. Somit ist mit zunehmender Maturierung über den *Chase*-Zeitraum keine Erkennung der markierten Precursorkomplexe durch die C8-Antikörper mehr möglich. Folglich sollte die Gesamtintensität der präzipitierten Precursorproteine (α - und pro β -Untereinheiten sowie POMP, die den Precursorkomplex formen) in Abhängigkeit von der Maturierung des Komplexes abnehmen. Wie in Abbildung 21C gezeigt, wurden mit fortschreitender *Chase*-Zeit zunehmend weniger Komplexe präzipitiert. Diese Abnahme der Intensitäten erfolgte bezüglich der Immunoprecursorkomplexe ca. fünfmal schneller als die der konstitutiven Precursorkomplexe. Verifiziert wurde dieser Befund durch eine spezifische Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen die humanen $\beta 5$ -Homologe. Aus dem Lysat unbehandelter Zellen wurde sowohl die Proform als auch das maturierte Protein von $\beta 5$ (MB1) präzipitiert. Analog dazu erfolgte eine Präzipitation von beiden $\beta 5i$ (LMP7)-Proteinen aus stimulierten Zellen. Aufgrund der Affinitäten beider Antikörper wurde unterschiedlich viel Protein immunpräzipitiert, was sich in verschiedenen Ausgangswerten der logarithmierten Pixeldichten widerspiegelt. Dennoch erlaubt der indirekte Vergleich über das Verhältnis der Anstiege der genähert linearen Funktionen eine Aussage über die Kinetik der Prozessierung der Proformen und damit der Reifung der entsprechenden Precursorkomplexe. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten der Proformen ergab eine mehr als dreifach schnellere Abnahme von pro-LMP7 im Vergleich zu pro-MB1 (Abbildung 21D).

Da in HeLa-Zellen nach allen bisher vorliegenden Erkenntnissen POMP nicht frei vorliegt, sondern hauptsächlich integriert in Precursorkomplexe, wird davon ausgegangen, dass POMP bei einer Immunpräzipitation sowohl mit MP3- als auch mit C8-Antikörpern quantitativ co-präzipitiert wurde. Somit konnte angenommen werden, dass die Stabilität dieses Proteins anhand dieser Immunpräzipitationen ausreichend charakterisiert werden kann. Der Versuch, die erhöhte POMP-Abbaurate zu visualisieren, indem spezifisch POMP immunpräzipitiert wurde, zeigte zwar die gleiche Tendenz auf, brachte allerdings nicht die erforderliche Präzipitationseffizienz für eine Quantifizierung (Abbildung 21E). Dies ist damit zu erklären, dass POMP möglicherweise im Precursorkomplex verborgen liegt und deswegen vom Antikörper nicht quantitativ immunpräzipitiert werden konnte (Ramos, et al., 1998).

Zusammenfassend belegen diese Daten, dass die Expression des Maturierungsfaktors POMP auch auf Proteinebene durch eine IFN γ -Stimulation induziert wird und POMP ebenfalls Komponente von Immuno-Precursorkomplexen ist. Diese Immuno-Precursorkomplexe maturieren mindestens dreifach schneller als die von konstitutiven Proteasomen, weshalb POMP in induzierten Zellen einem beschleunigten Abbau unterliegt. Somit wurde erstmalig nachgewiesen, dass sich die Assemblierung konstitutiver 20S-Proteasomen von der von Immunoproteasomen zumindest hinsichtlich der Kinetik der Maturierung deutlich unterscheidet.

3.2.3 LMP7 determiniert anhand der Maturierungskinetik von Immuno-Precursorkomplexen die POMP-Stabilität

Im Rahmen der Untersuchungen zur Expression von POMP in verschiedenen humanen Zelllinien (s. 3.2.1) und der Kinetik der Proteasom-Maturierung (s. 3.2.2) wurden zwei Sonderfälle beobachtet. Im Gegensatz zu allen anderen Zellen, wurde in Zellen der humanen Colonicarcinom-Zelllinie Rko sowie der Lymphoblastoma-Zelllinie T2 erstmals eine Induktion von POMP sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene nach IFN γ -Stimulation beobachtet (Abbildung 22).

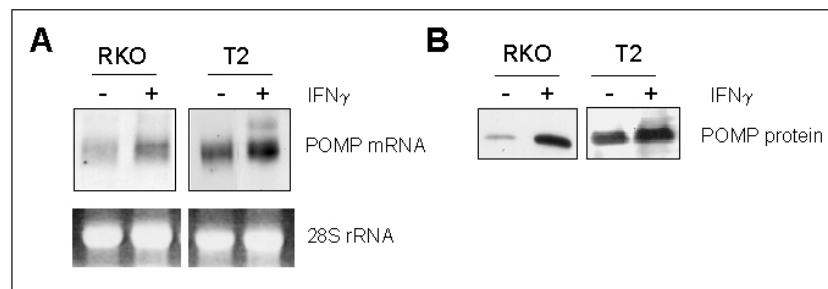


Abbildung 22: Expression des Proteasom-Maturierungsfaktors POMP in den humanen Zelllinien Rko (Colonicarcinom) und T2 (Lymphoblastoma) in Abhängigkeit von deren IFN γ -Exposition. Die Zellen wurden in Ab- [-] bzw. Anwesenheit [+] von IFN γ kultiviert, deren Gesamt-RNA isoliert und mittels Northern Blot mit POMP-spezifischen Sonden die POMP-mRNA-Expression untersucht (A). Als interner Standard dienten die Ethidiumbromid-gefärbten 28S rRNA-Banden im Gel vor dem Blotten. Per Immunoblot und spezifischem Antikörper wurde POMP in normierten Mengen Gesamtproteinlysats (50 μ g) nachgewiesen (B).

Die Induktion der mRNA-Menge wurde mittels *Northern Blot*-Analyse (Abbildung 22A), die erhöhte Expression des Maturierungsproteins mittels Immunoblot auf Gesamtproteinlysaten der Zellen nachgewiesen (Abbildung 22B). Dies steht im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Zelllinien (vgl. Abbildung 18), in denen zwar die POMP-mRNA induziert wurde, aber im Immunoblot auf Gesamtproteinlysats keine erhöhten POMP-Proteinmengen aufgrund der erhöhten POMP-Abbauraten detektiert werden konnten. Somit lag nahe, dass in diesen Zelllinien zwar POMP erwartungsgemäß in seiner Expression durch IFN γ induziert wurde, der gesteigerte Abbau im Verlauf der Immunoproteasom-Maturierung aber ausbleibt. Um dies zu untersuchen, wurden *Pulse Chase*-Experimente mit Rko-Zellen in Abhängigkeit von deren vorheriger Cytokinstimulation durchgeführt (vgl. 3.2.2). Wie Abbildung 23A zeigt, wurde POMP in Rko-Zellen nach IFN γ -Exposition langsamer degradiert als in den unbehandelten Kontrollzellen. Das Gegenteil wurde in HeLa-Zellen beobachtet (vgl. Abbildung 20). Beide Zelllinien weisen vergleichbare Proliferationsraten auf. In stimulierten HeLa-Zellen war POMP nach einem *Chase* von 2h nicht mehr zu detektieren, in stimulierten Rko-Zellen blieb POMP über den gesamten *Chase*-Zeitraum von 4h sichtbar. Das Maturierungsprotein war (im Gegensatz zu HeLa-Zellen) in stimulierten Rko-Zellen sogar wesentlich stabiler als in den unbehandelten Zellen. Die retardierte POMP-Degradation in induzierten Rko-Zellen ging auch mit einer verzögerten Maturierung von

LMP2 einher (Abbildung 23B). Beim Vergleich der Intensitäten der mLMP2-Bande von stimulierten Rko-Zellen mit der von stimulierten HeLa-Zellen nach einer *chase*-Zeit von 1h wird eine wesentlich geringe Maturierungseffizienz der Immuno-Precursorkomplexe von Rko-Zellen deutlich.

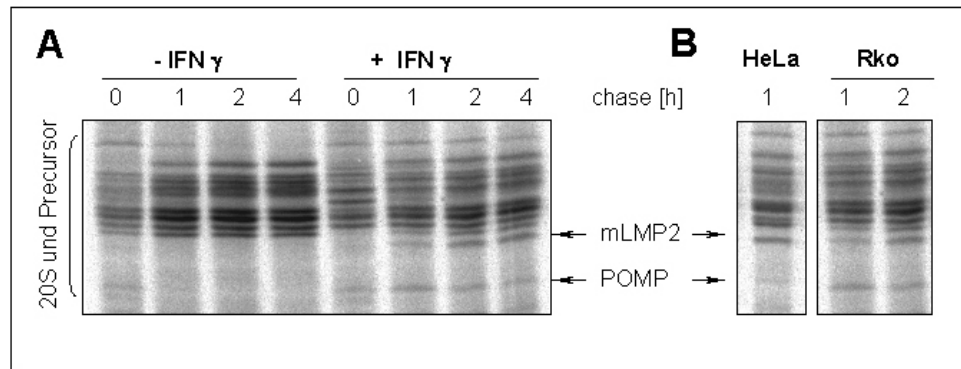


Abbildung 23: In IFN γ -behandelten Rko-Zellen ist kein erhöhter POMP-Abbau zu beobachten, gegenteilig ist sogar eine Stabilisierung in Immuno-Precursorkomplexen zu konstatieren. Vor der metabolischen ^{35}S -Methionin-Markierung [1.5h *Pulse*] wurden Rko-Zellen zunächst Ab- [-] bzw. Anwesenheit [+] von IFN γ kultiviert. Proteasomale Komplexe (reifes 20S und Precursor) wurden mittels spezifischen anti-Proteasom-Antikörpern (MP3) aus Gesamtproteinlysaten von Zellen immunpräzipitiert, die nach dem *Pulse* für verschiedene Zeiträume (*Chase*, bis zu 4h) in Vollmedium weiter kultiviert wurden. Nach der Auftrennung im SDS-PAGE wurden die radioaktiv markierten Proteine autoradiographisch visualisiert (A). Mit der retardierten POMP-Degradation in stimulierten Rko-Zellen geht eine ineffizientere Maturierung von LMP2 im Vergleich zu stimulierten HeLa-Zellen einher (B).

Die humane T2-Zelllinie zeichnet sich durch eine umfangreiche Deletion innerhalb des MHC II-Locus aus, die sowohl die Immununtereinheiten LMP2 (*PSMB9*) und LMP7 (*PSMB8*) als auch die TAP-Transporter umfasst (Ortiz-Navarrete, et al., 1991; Salter and Cresswell, 1986). Möglicherweise könnte somit die erhöhte POMP-Stabilität in induzierten T2- und Rko-Zellen auf eine Dysregulation der Immununtereinheiten zurückzuführen sein. Um diesen möglichen Zusammenhang zu prüfen, wurden beide Zelllinien auf die Expression von IFN γ -induzierbaren Proteinen in Abhängigkeit vom Cytokin-Stimulus untersucht. Abbildung 24 zeigt eine Analyse der Immununtereinheit LMP7 ($\beta 5i$) auf mRNA-Ebene (A) und auf Proteinebene (B). T2-Zellen erwiesen sich erwartungsgemäß als LMP7-defizient. In Rko-Zellen wurde die LMP7-mRNA nach Cytokinstimulation induziert (Abbildung 24A), allerdings deutlich schwächer als in anderen humanen Zellen, die analog stimuliert wurden (vgl. Abbildung 19A). Überraschenderweise resultierte diese mRNA-Induktion nicht in einer deutlichen Expression des LMP7-Proteins (Abbildung 24 B). Es wurde zwar eine schwache LMP7-Bande im Immunblot stimulierter Rko-Zellen detektiert, aber deren Intensität war wesentlich schwächer als das mit dem gleichen Antikörper detektierte LMP7-Signal in Gesamtlysaten anderer stimulierter Zellen (vgl. Abbildung 19 B).

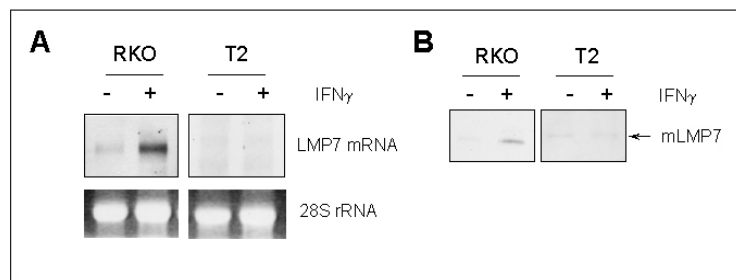


Abbildung 24: Expression der IFN γ -induzierbaren Immununtereinheit LMP7 (β 5i) in humanen Rko und T2-Zellen. (A) Chemiluminogramm einer *Northern Blot*-Analyse bezüglich LMP7-mRNA in Gesamt-RNA-Isolaten in Abhängigkeit von der vorheriger Cytokin-Stimulation der Zellen. Als interner Standard dienen die Ethidiumbromid-gefärbten Banden der 28S rRNA. Anhand einer *Western Blot*-Analyse (B) sollte in den korrespondierenden Gesamtproteinlysaten LMP7-Protein nachgewiesen werden.

Um die Ursache der LMP7-Defizienz von Rko-Zellen zu ermitteln, wurde zunächst die prinzipielle Funktionalität des IFN γ -Signaltransduktionsweges bezüglich der induzierbaren Proteasom-Komponenten LMP2 (β 1i), MECL-1 (β 2i) und PA28 α/β geprüft. Dass sowohl das MECL-1 (β 2i)-Transkript (Abbildung 25A) als auch die Proteine LMP2 (β 1i) und PA28 α/β (Abbildung 25B) durch das Cytokin signifikant induziert wurden, belegt eine prinzipielle IFN γ -Stimulierbarkeit dieser Zellen. In keinem der durchgeführten Experimente wurde in stimulierten Rko-Zellen eine quantitative Reifung des LMP2-Proteins beobachtet. In diesen Zellen lag LMP2 zu großen Anteilen als Proform [p] vor (s. Abbildung 25B). Diese unzureichende LMP2-Maturierung in Rko-Zellen hat ihre Ursache in einem Mangel an LMP7, da Immuno-Precursorkomplexe mit kooperativ inkorporiertem pro-MECL-1 und pro-LMP2 ohne pro-LMP7 kaum maturieren (s. Kapitel 1.5.5). Dagegen wird in Zellen mit genügender LMP7-Protein-Expression ausschließlich pro-LMP7 in diese Precursorkomplexe dirigiert, woraufhin alle Immununtereinheiten quantitativ reifen. Deshalb wurde in diesen Zellen nahezu ausschließlich die reife [m]-Form von LMP2 in Immunblots auf Gesamtproteinlysaten detektiert (vgl. Abbildung 19 B).

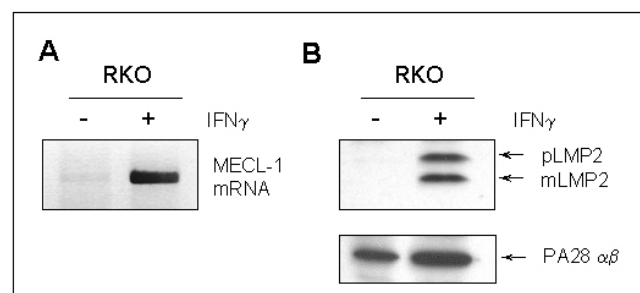


Abbildung 25: In Rko-Zellen ist der IFN γ -Signaltransduktionsweg für MECL-1, LMP2 und PA28 funktionell. Rko-Zellen wurden unter Ab- [-] bzw. Anwesenheit [+IFN γ] des Cytokins kultiviert. Die mRNA der Immununtereinheit MECL-1 wird durch IFN γ induziert (semiquantitative RT-PCR, A). Der Immunoblot auf normierte Gesamtproteinextrakt-Mengen zeigt eine eindeutige Induktion sowohl der Immununtereinheit LMP2 (β 1i, Proform [p] sowie maturiertes Protein [m]) als auch der Proteasom-Aktivator-Proteine PA28 α/β in stimulierten Rko-Zellen (B).

3.2.4 Die humanen LMP7-Transkriptvarianten E1 und E2

Die Diskrepanz zwischen der eindeutigen Induktion der mRNA von Immunountereinheiten und der fehlenden Proteinexpression von LMP7 ($\beta 5i$) in $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten Rko-Zellen sollte durch eine genauere Analyse aufgelöst werden. Das humane *PSMB8* (LMP7)-Gen zeigt eine Einzigartigkeit gegenüber allen weiteren, näher charakterisierten LMP7-Genen (z.B. Maus oder Ratte) auf. Vom humanen Gen werden zwei Varianten LMP7_E1 und LMP7_E2 transkribiert, die sich ausschließlich bezüglich des jeweils ersten Exons (mit zugehöriger 5'UTR) unterscheiden. Die codierten, putativen Proteine sind nur hinsichtlich des Propeptids verschieden, während die maturierten Proteine identisch wären (s. Kapitel 1.6). Nur das für die Immunoproteasom-Formation essentielle LMP7_E2 wird durch $\text{IFN}\gamma$ auf Transkript- und Proteinebene signifikant induziert. Es ist nicht sicher, ob das LMP7_E1-Transkript mit unbekannter Funktion überhaupt *in vivo* quantitativ translatiert wird. Wahrscheinlich ist, dass das LMP7_E1-Protein zwar exprimiert, aber aufgrund der veränderten Prosequenz nur unzureichend in Immuno-Precursorkomplexe inkorporiert und somit evtl. bereits als Monomer degradiert wird (s. Kapitel 1.6). Eine semiquantitative RT-PCR-Analyse der Expression der beiden alternativen LMP7-Transkripte zeigt Abbildung 26 auf. In humanen Zellen mit dominanter LMP7-Protein-Expression wie HeLa oder SW-480 (vgl. Abbildung 19) wurden die alternativen Transkripte nach Cytokinexposition in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten exprimiert (Fruh, et al., 1992; Glynne, et al., 1993; Yang, et al., 1995). HeLa- und SW-480-Zellen reagierten auf einen $\text{IFN}\gamma$ -Stimulus mit einer signifikanten Induktion des LMP7_E2-Transkripts, die LMP7_E1-Variante hingegen wurde konzentriert reprimiert.

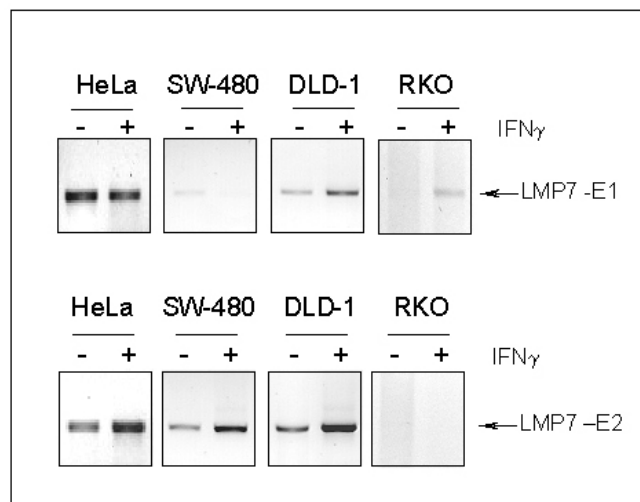


Abbildung 26: Semiquantitative RT-PCR-Analyse zur Expression der alternativen LMP7-Transkripte LMP7_E1 und LMP7_E2 in verschiedenen humanen Zelllinien in Abhängigkeit von deren Cytokin-Stimulation. Gesamt-RNA wurde aus stimulierten [+ $\text{IFN}\gamma$] und Kontrollzellen [- $\text{IFN}\gamma$] isoliert und die mRNA mittels oligo(dT)-Primern revers transkribiert. Eine anschließende PCR mit normierten cDNA-Mengen und Transkript-spezifischen Primern für LMP7_E1 (obere Reihe) bzw. LMP7_E2 (untere Reihe) zeigte semiquantitativ deren Expression in Abhängigkeit vom Cytokin-Stimulus auf.

In DLD-1-Zellen war eine Induktion von LMP7 sowohl als LMP7_E2-mRNA als auch als Protein (vgl. Abbildung 19) zu beobachten. Die LMP7_E1-mRNA wurde nach einer IFN γ -Stimulation nicht geringer exprimiert. Inwieweit diese fehlende Reduktion von Bedeutung ist, kann aufgrund der unbekannten Funktion des LMP7_E1-Transkripts nicht abgeschätzt werden. Eine vollständige Dysregulation der LMP7-Transkripte wurde in Rko-Zellen beobachtet (Abbildung 26). In mehreren unabhängigen Experimenten konnte keinerlei Expression der Immunoproteasom-relevanten LMP7_E2-mRNA in Rko-Zellen nachgewiesen werden, weder auf basalem Niveau in unbehandelten Zellen noch induziert in IFN γ -stimulierten Zellen. Auch das LMP7_E1-Transkript wurde basal kaum exprimiert, nur in stimulierten Zellen konnte eine schwache Expression belegt werden. Die per *Northern Blot*-Analyse nachgewiesene Induktion von der LMP7-mRNA (Abbildung 24A) erklärt sich somit ausschließlich als Expression von LMP7_E1-mRNA, von der bisher *in vivo* keine detektierbare Proteinexpression dokumentiert werden konnte. Daraus resultiert der fehlende Nachweis des LMP7-Proteins in Immunoblots auf Gesamtproteinlysaten von IFN γ -stimulierten Rko-Zellen, obwohl eine Induktion der LMP7-mRNA erfolgte.

3.2.5 Partielle Kompensation der POMP-Stabilität in stimulierten Rko-Zellen durch LMP7_E2-Transfektion

Um nachzuweisen, dass die in Rko-Zellen ausbleibende Destabilisierung des Maturierungsproteins POMP ausschließlich auf das Fehlen inkorporationsfähigen LMP7-Proteins und der daraus resultierenden Verzögerung der Immunoproteasom-Maturierung zurückzuführen ist, wurden Rko-Zellen mit verschiedenen LMP7-Konstrukten transfiziert. Rko-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für LMP7_E1 bzw. LMP7_E2 transfiziert (s. Kapitel 2.4.3 und 2.10.2.1), nach 4h mit IFN γ stimuliert und nach weiteren 20h lysiert. Mittels Immunoblots von normierten Mengen Gesamtllysats (50 μ g) wurde die Expression von LMP7 nachgewiesen.

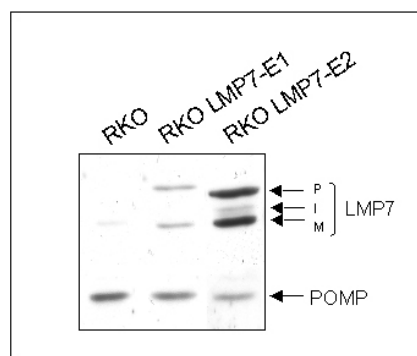


Abbildung 27: Reduktion von POMP in LMP7-transfizierten, IFN γ -induzierten Rko-Zellen. Rko-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für LMP7_E1 bzw. LMP7_E2 transfiziert, anschließend wurden alle Zellen (einschließlich der nicht transfizierten Rko-Kontrollzellen) mit IFN γ stimuliert und nach 24h lysiert. In einem Immunoblot auf Gesamtproteinlysaten wurde mittels spezifischer Antikörpern die Expression von POMP und LMP7 (Proform mit vollständigem Propeptid [p], Intermediärform mit partiell verkürztem Propeptid [i] und reifes [m] LMP7) überprüft.

Wie Abbildung 27 zeigt, wurde das in Immunoproteasom inkorporierbare LMP7_E2-Protein deutlich exprimiert. Da sowohl die Proform als auch das maturierte LMP7-Protein detektiert wurden, wurde proLMP7_E2 offensichtlich in naszierende Immunoproteasomen eingebaut und im Zuge der Immunoproteasom-Maturierung prozessiert. Daraus kann geschlossen werden, dass IFN γ -induzierte Rko-Zellen, deren LMP7_E2-Defizienz durch entsprechende Transfektion kompensiert wurde, prinzipiell in der Lage sind, reifes Immunoproteasom zu generieren. Damit verbunden konnte eine deutliche Verringerung des POMP-Proteingehaltes im Vergleich zu nicht transfizierten, IFN γ -stimulierten Rko-Zellen beobachtet werden. Eine Transfektion mit dem funktionell nicht charakterisierten LMP7_E1-Konstrukt führte zu einer schwachen Expression von LMP7_E1, was mit bereits publizierten Daten übereinstimmt (Yang, et al., 1995). Im Gegensatz zur *in vivo*-Situation (s.o.) kann nach der Transfektion mit entsprechenden Expressionsvektoren, die aufgrund der hohen CMV-Promotor-Aktivität sehr stark exprimiert werden, LMP7_E1 auch als Protein detektiert werden. Sowohl die LMP7_E1-Proform als auch das maturierte Protein wurden nur sehr schwach detektiert. Die marginale Expression von LMP7_E1 resultierte nur in einer geringfügigen Reduktion des POMP-Gehaltes in stimulierten Rko-Zellen.

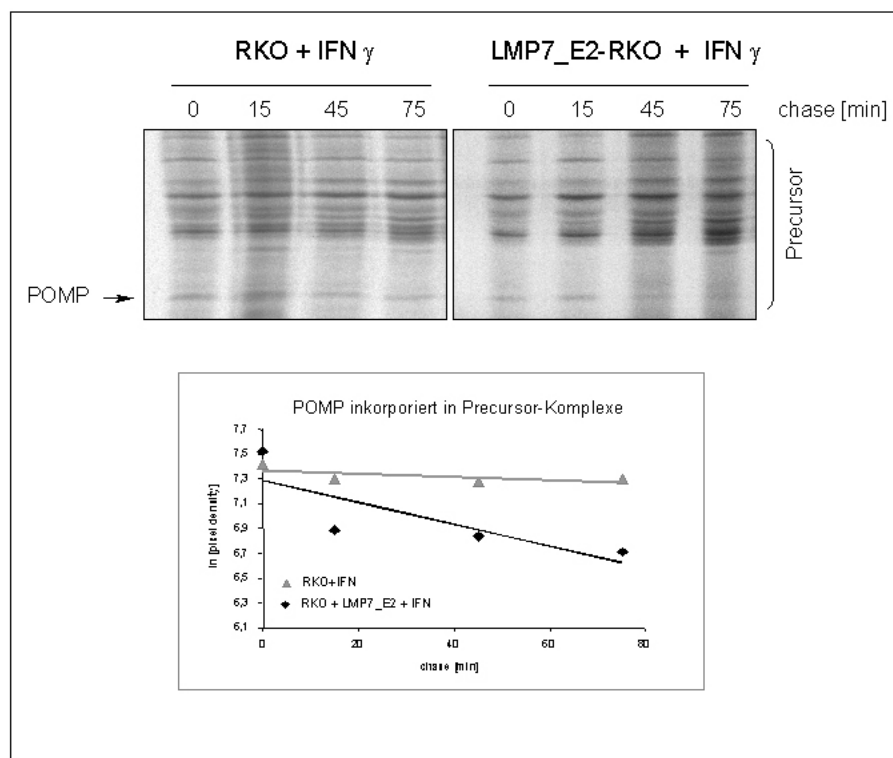


Abbildung 28: Destabilisierung von POMP in LMP7-transfizierten, IFN γ -induzierten Rko-Zellen. Sowohl LMP7-defiziente Rko-Zellen als auch Zellen der stabilen LMP7_E2-Rko-Linie wurden vor dem *Pulse Chase*-Experiment für 24h mit IFN γ stimuliert. Nach den angegebenen *Chase*-Zeiten wurden die Zellen lysiert und aus dem ^{35}S -markierten Gesamtproteinlysate spezifisch proteasomale Precursor-Komplexe immunpräzipitiert (C8-Antikörper). Die jeweiligen Fluorogramme der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Precursor-Komplexe und die zugehörige Quantifizierung sind abgebildet.

Um zu überprüfen, ob durch eine LMP7_E2-Transfektion in stimulierten Rko-Zellen die beschleunigte Immunoproteasom-Maturierung und die damit verbundene POMP-Destabilisierung rekonstituiert werden können, wurden verschiedene stabile Rko-Klone, die 'konstitutiv', also ohne IFN γ -Stimulation, LMP7_E2 exprimieren, generiert (s. Kapitel 2.10.3). Vier dieser LMP7_E2-Rko-Klone wurden in verschiedenen *Pulse Chase*-Experimenten hinsichtlich der Kinetik der Immunoproteasom-Maturierung untersucht. Diese Kinetik wurde mit der Reifung von Proteasomen von LMP7-defizienten Rko-Zellen verglichen. Dazu wurden die Zellen jeweils mit IFN γ stimuliert und Precursorkomplexe mittels spezifischem C8-Antikörper immunpräzipitiert (s. Abbildung 28). In stimulierten und LMP7_E2 exprimierenden Rko-Zellen war POMP durchschnittlich vierfach instabiler als in stimulierten Rko-Zellen. Diese Destabilisierung des Maturierungsfaktors konnte jedoch nur in Zellen eines stabilen Klons beobachtet werden. Ausserdem wurde POMP zwar schneller in der induzierten Transfektante als in induzierten Zellen umgesetzt, besaß aber eine vergleichbare Stabilität zu POMP in konstitutiven Precursorkomplexen von nicht stimulierten Zellen (vgl. Abbildung 23). Dies entsprach nicht dem Phänotyp von z.B. stimulierten HeLa-Zellen, wo POMP mindestens dreifach schneller degradiert wurde als in den unstimulierten Kontrollzellen (vgl. Kapitel 3.2.2). Somit konnte durch die LMP7_E2-Transfektion von Rko-Zellen nur eine partielle Kompensation der POMP-Stabilität erzielt werden.

3.2.6 Die Maturierungskinetik von Immunoproteasomen ist eine ausschließlich intrinsische Eigenschaft der Komplexe

Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, maturieren Immunoproteasomen in IFN γ -stimulierten Zellen schneller als konstitutive 20S-Proteasomen in unbehandelten Kontrollzellen, was in einer Destabilisierung des Maturierungsfaktors von POMP in stimulierten Zellen resultiert. Ob dieses Phänomen auf einer intrinsischen Eigenschaft von Immuno-Precursorkomplexen beruht oder durch mögliche weitere, IFN γ -induzierte Faktoren verursacht wird, war Gegenstand weiterer Experimente. Diese sollten zeigen, ob die POMP-Stabilität in immunoproteasomalen Precursorkomplexen ausschließlich durch die Kinetik der Immunoproteasom-Maturierung determiniert wird. Dazu wurden T2-Zellen (die LMP2 und LMP7 defizient sind, aber MECL-1 exprimieren) und deren Transfektanten, die stabil und unabhängig von einem Cytokin-Stimulus verschiedene Derivate von humanen Immunountereinheiten exprimieren, genutzt. Die diesbezüglichen Experimente wurden von Frau Dr. E. Krüger durchgeführt und sind im Verbund mit den hier vorgelegten Daten zur Publikation eingereicht. In Abbildung 29A sind LMP7- und POMP-Immunoblots auf jeweils 50 μ g Gesamtproteinlysate der verschiedenen T2-Derivate (s. Kapitel 2.10) dargestellt. In den verschiedenen Zelllinien wurden sehr unterschiedliche Mengen an POMP detektiert. Es wurde jedoch keinerlei Einfluß der Transfektionen auf die POMP-Transkriptmenge per *Northern Blot* nachgewiesen. Somit basieren die unterschiedlichen Expressionsniveaus von POMP ausschließlich auf einer posttranslationalen Destabilisierung von

POMP in den einzelnen Zelllinien. In LMP7-exprimierenden T2-Zellen (T2 LMP7) wurde deutlich weniger POMP als in T2-Zellen detektiert. Eine Transfektion mit LMP2 allein (T2 LMP2) hatte keinen Einfluss auf die POMP-Stabilität. In der Doppeltransfektante (T2 LMP2+7) übte die Existenz von LMP2 nur einen geringfügig zusätzlichen, destabilisierenden Effekt auf POMP aus, wie der Vergleich zur LMP7-Transfektante zeigt. Die Destabilisierung von POMP hängt also ausschlaggebend von der Existenz von LMP7 ab (s. *Pulse Chase*-Experiment, Abbildung 29C), wie bereits die Rko-Experimente andeuteten (vgl. Kapitel 3.2.5). Dass die Destabilisierung von POMP in diesen Zelllinien wiederum von der Maturierungskinetik der Proteasomen determiniert wird, wurde durch Immunoblots gegen LMP2 und LMP7 verifiziert (Abbildung 29B). LMP2 reifte in (LMP7-defizienten) T2-Zellen nur unzureichend zu maturiertem Protein, wie der Vergleich der Intensitäten von Proform [p] und maturiertem [m] LMP2 indiziert (Abbildung 29B). Dies liegt darin begründet, dass T2 Zellen MECL-1 'konstitutiv' exprimieren und somit in T2 LMP2-Zellen Immunoprecursorkomplexe mit proLMP2 und pro-MECL-1 formiert werden. Deren Maturierung wird jedoch ausschließlich durch die Inkorporation von pro-LMP7 eingeleitet (s. Kapitel 1.5.5). Dies konnte für die Doppeltransfektante (T2 LMP2+7) belegt werden, in deren Lysat fast ausschließlich die reife Form von LMP2 detektiert wurde. Im Gegensatz dazu ist die Maturierung von LMP7 nicht in diesem Maße von der Existenz von LMP2 abhängig. Bereits in der 'einzeln' T2 LMP7-Transfektante reifte LMP7 effizient (Abbildung 29A), coexprimiertes LMP2 (T2 LMP2+7) bewirkte nur eine schwache Reduktion der intermediären LMP7-Proform.

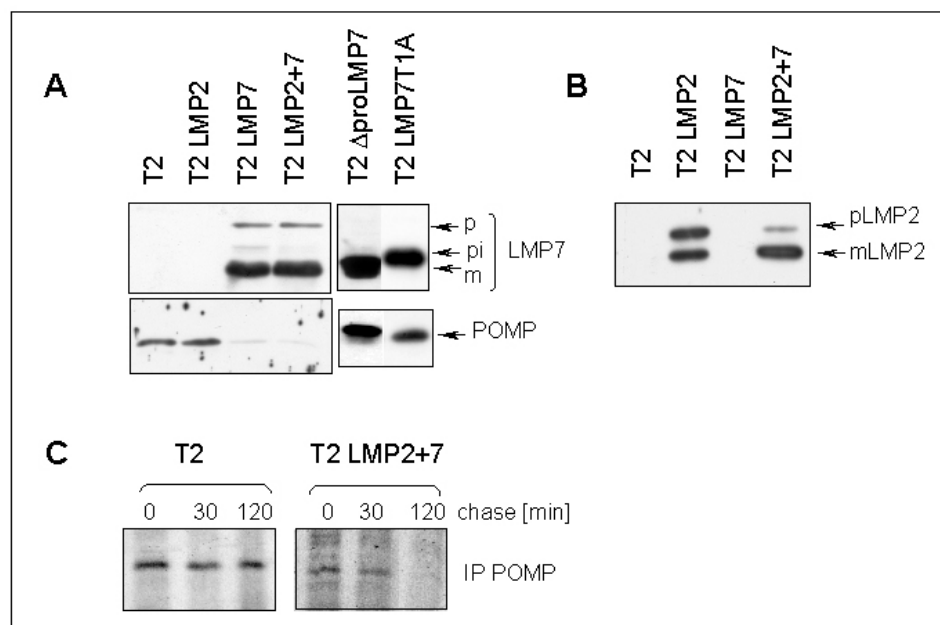


Abbildung 29: Der POMP Turnover hängt ausschließlich von aktivem LMP7 ab. Verschiedene stabile Derivate der LMP2/LMP7-defizienten T2-Zelllinie (Singletransfektanten LMP2 bzw. LMP7; Doppeltransfektante LMP2 und LMP7; Propetid-trunkierte LMP7- [Δpro] bzw. inaktive [T1A] LMP7-Varianten) wurden mittels Immunoblot mit normierten Mengen Gesamt-Proteinlysats auf die Expression der Immununtereinheiten LMP7 (A) und LMP2 (B) bzw. des Maturierungsfaktors POMP (A) getestet. Der erhöhte POMP-Umsatz in LMP2/LMP7-exprimierenden T2- im Vergleich zu T2-Zellen wurde mittels *Pulse Chase*-Experimenten bestätigt (C). Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. E. Krüger

Die schnellere Immunoproteasom-Maturierung hängt sowohl von effektiv inkorporierbarem LMP7-Protein als auch von dessen Aktivität ab, da eine POMP-Destabilisierung weder in den Δ proLMP7- noch in den LMP7_T1A- T2-Zellen festzustellen war. Somit bewirkt ausschließlich die Existenz von aktivem LMP7-Protein die erhöhte Umsatzrate des Maturierungsfaktors POMP. In T2-Zellen geschieht dies unabhängig vom Cytokinstimulus, der in anderen Zellen eine effiziente Immunoproteasom-Formation erst ermöglicht.

3.2.7 Die humanen *PSMB8*-Allele LMP7_E2_Q und LMP7_E2_K

Wie in Kapitel 1.6 beschrieben, ist das humane *PSMB8*-Gen in geringem Ausmaß polymorph. Neben vier Polymorphismen in Intron-Bereichen, wurden zwei verschiedene Allele, die sich auch in einer Änderung des Proteins widerspiegeln, beschrieben. Der zugrunde liegende *single nucleotide polymorphism* (SNP) des Nucleotids 145 (direkt am Übergang von Exon2 zu Intron3) resultiert in einer Aminosäure-Variation von Glutamin (Q) bzw. Lysin (K) an Position 49. Der Austausch betrifft somit ausschließlich das Propeptid der Immunoproteasom-relevanten LMP7_E2-Variante. Im Rahmen einer Kooperation mit Frau Dr. B. Fellerhoff, Institut für Immunologie der medizinischen Fakultät der LMU München, wurden die Studien zur Immunoproteasom-Assemblierung in Abhängigkeit von der Expression verschiedener humaner LMP7-Varianten in Colocarzinom-Zelllinien ausgeweitet. Zwei von Frau Dr. Fellerhoff als *PSMB8*-homozygot charakterisierte humane Colocarzinom-Zelllinien Colo 205 („Q/Q“) und Caco-2 („K/K“) wurden hinsichtlich der Expression verschiedener IFN γ -induzierbarer Proteasomen-Komponenten getestet (Abbildung 30). In den „Q/Q“-homozygoten Colo 205-Zellen wurde die Immununtereinheit LMP7 sowohl als LMP7_E2-mRNA (Abbildung 30A) als auch als Protein (Abbildung 30B) signifikant durch IFN γ induziert.

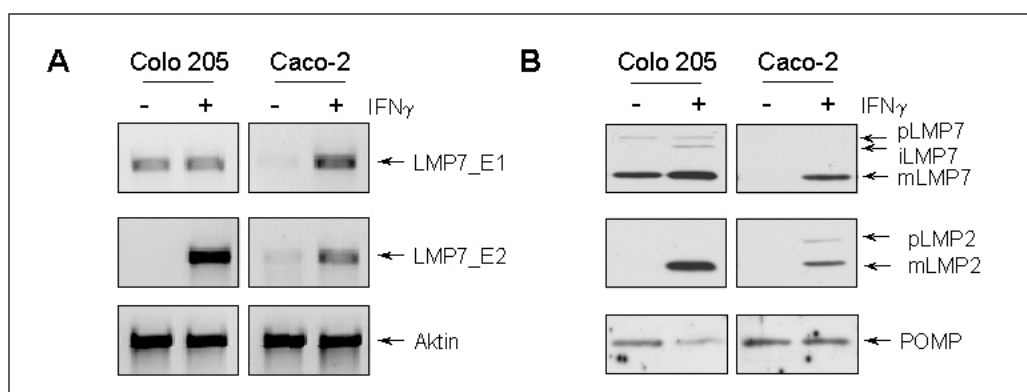


Abbildung 30: Die Expression IFN γ -induzierbarer proteasomaler Komponenten in den humanen Colocarzinomzellen Colo 205 und Caco-2. Die Zellen wurden unter Ab- [-] bzw. Anwesenheit [+] von IFN γ kultiviert. Die daraus isolierte Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die cDNA mittels transkript-spezifischen Primern (LMP7_E1 bzw. LMP7_E2) semiquantitativ amplifiziert (A). Als interner Standard diente Aktin. Aus den Zellen gewonnenes Gesamtproteinlysate (auf je 50 μ g normiert) wurde mittels Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen die Immununtereinheiten LMP2 und LMP7 sowie gegen das Maturierungsprotein POMP analysiert (B).

Dies ging mit einer vollständigen Maturierung des LMP2-Proteins und einem verstärkten, zu anderen humanen Zellen vergleichbaren, Abbau (vgl. Abbildung 18) des Maturierungsfaktors POMP einher (Abbildung 30B). Im Gegensatz dazu wurde POMP in stimulierten „K/K“-homozygoten Caco-2-Zellen nicht verstärkt umgesetzt und die Immununtereinheit LMP2 reifte unvollständig (Abbildung 30B). Ursache dieser unzureichenden Immunoproteasom-Maturierung ist eine reduzierte Expression der Immununtereinheit von LMP7 in Caco-2-Zellen (Abbildung 30A und B). Sowohl die mRNA- als auch die Protein-Induktion der ins Immunoproteasom inkorporierten LMP7_E2-Form fiel bei diesen Zellen schwächer aus als bei Colo 205-Zellen. Wie auch bei Rko-Zellen beobachtet (vgl. Abbildung 26), wurde hier allerdings das LMP7_E1-Transkript durch IFN γ stark induziert.

Die im Vergleich zu der in Colo 205-Zellen beeinträchtigte Immunoproteasom-Reifung in Caco-2-Zellen sollte anhand von Immunoblots auf Dichtegradientenfraktionen der Lysate jeweils IFN γ -stimulierter Zellen näher analysiert werden. Wie Abbildung 31 zeigt, reiften in stimulierten Colo 205-Zellen Immunoproteasomen vollständig. Dies ist charakterisiert durch eine verminderte POMP-Stabilität im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen und eine nahezu vollständige Maturierung von LMP2. LMP7 hingegen erschien sowohl als reifes [m] als auch als unprozessiertes Protein mit Propeptid [p]. Diese Konstellation (nahezu ausschließlich mLMP2, sowohl mLMP7 und pLMP7) ist als Normalfall zu betrachten, da sie in der Mehrzahl der untersuchten humanen Zelllinien beobachtet wurde (vgl. Abbildung 19). Im Gegensatz dazu wurde in den Immunoblots der stimulierten Caco-2-Zellen ausschließlich maturiertes LMP7, aber neben maturiertem LMP2 auch signifikante Mengen der LMP2-Proform detektiert (Abbildung 31). Abgesehen von der Stabilisierung von POMP in Immunoprecursor-Komplexen im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen konnte auch eine Anreicherung von POMP in den Fraktionen geringer Dichte (# 20 und 21) detektiert werden.

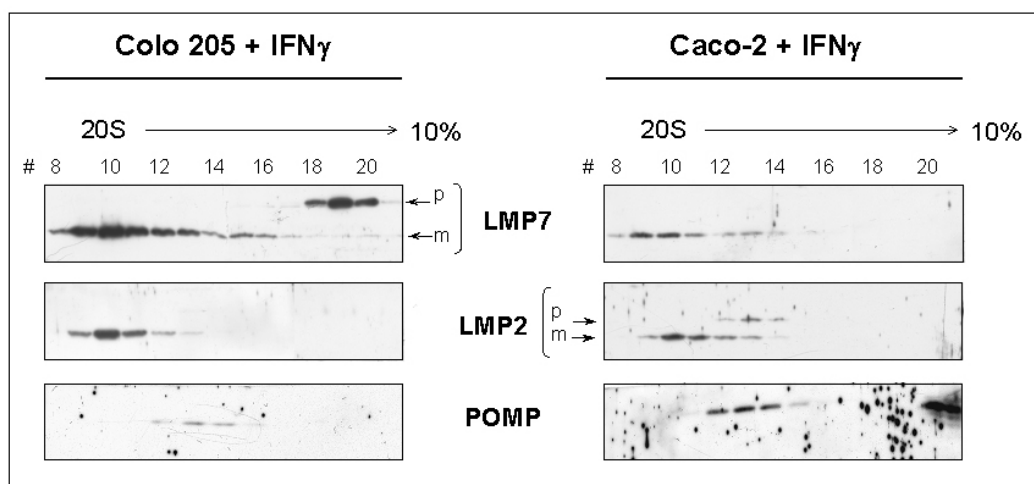


Abbildung 31: Die POMP-Destabilisierung in IFN γ -stimulierten Zellen ist ein LMP7-dosisabhängiger Effekt. Aus den IFN γ -stimulierten Colo 205- bzw. Caco-2-Zellen gewonnenes Gesamtproteinlysate wurde per Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und die Fraktionen per Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen die Immununtereinheiten LMP2 und LMP7 sowie gegen das Maturierungsprotein POMP analysiert.

Zusammenfassend wiesen diese Charakteristika auf eine unvollständige Maturierung von Immunoproteasomen in IFN γ -stimulierten Caco-2-Zellen hin. Dies ist wahrscheinlich auf eine ungenügende LMP7_E2-Proteinexpression in diesen Zellen zurückzuführen. Die Menge exprimierten LMP7-Proteins reichte nicht aus, um das konzentriert IFN γ -induzierte POMP quantitativ in naszierende Immunoprecursor-Komplexe zu dirigieren. Das ebenfalls IFN γ -induzierte LMP2 wurde zwar vollständig in Precursorkomplexe inkorporiert, aber nur in einen Teil dieser Komplexe wurde LMP7 inkorporiert und besaß damit eine Konformation, die eine Prozessierung von LMP2 erlaubte. Der andere Teil verblieb möglicherweise aufgrund der ungenügenden LMP7-Menge in dieser Precursorkonformation mit unprozessiertem LMP2.

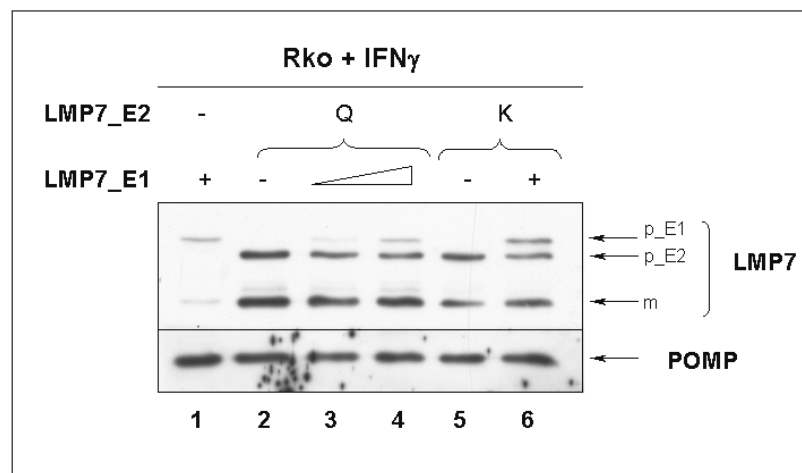


Abbildung 32: LMP7_E1 beeinflusst nicht die Expression verschiedener LMP7_E2-Varianten. Rko-Zellen wurden mit verschiedenen Expressionsplasmiden (LMP7_E1, LMP7_E2_K bzw. LMP7_E2_Q) transient transfiziert und anschließend mit IFN γ -stimuliert. Die Expression von LMP7 und POMP wurde mittels Immunoblot auf normierten Gesamtproteinmengen (je 50 μ g) analysiert.

Neben der bereits beschriebenen Aminosäure-Variation (Q/K) zeichnen sich Caco-2-Zellen auch dadurch aus, dass in diesen Zellen eine IFN γ -Stimulation in der Induktion der LMP7_E1-mRNA resultierte. Ob also entweder die LMP7_E2-Aminosäure-Variation oder die verstärkte Expression von LMP7_E1-mRNA eine für die vollständige Maturierung der Immuno-Precursorkomplexe ausreichende LMP7-Expression in Caco-2-Zellen verhinderte, war unklar. Um dies zu untersuchen, wurde auf die bereits als LMP7-Protein-defizient charakterisierte Zelllinie Rko (vgl. Kapitel 3.2.3 und 3.2.4) zurückgegriffen. Rko-Zellen wurden mit verschiedenen Expressionsvektoren für LMP7_E1, LMP7_E2_K bzw. LMP7_E2_Q (s. Kapitel 2.4.3) transient transfiziert. Nach einer IFN γ -Stimulation exprimieren Rko-Zellen zwar endogen LMP7_E1-mRNA, diese wird *in vivo* aber nicht zu LMP7-Protein translatiert (vgl. 3.2.4). Nach der Transfektion wurden die Zellen IFN γ -stimuliert, lysiert und normierte Mengen (50 μ g) Gesamtproteinlysats per Immunoblot analysiert. Wie in Abbildung 32 gezeigt, wurde LMP7_E1 nach Überexpression schwach als Protein exprimiert (Spur1). Unabhängig von der Aminosäurevariation wurde weder

die Expression von LMP7_E2_Q noch die Expression von LMP7_E2_K durch die parallele Transfektion mit unterschiedlichen Mengen an LMP7_E1 signifikant beeinflusst. Zwar deutete sich für LMP7_E2_Q eine geringfügige Reduktion sowohl der Proform als auch des prozessierten Proteins durch die Cotransfektion mit LMP7_E1 an (vgl. Spur 2 und 3), aber diese Reduktion konnte durch gesteigerte Dosen von LMP7_E1 nicht verstärkt werden (Spur 4). Für LMP7_E2_K konnte keine Reduktion der Expression in stimulierten Rko-Zellen aufgrund der Cotransfektion mit LMP7_E1 beobachtet werden (vgl. Spur 5 und 6). Die LMP7-Expression von LMP7_E2_K erschien trotz normierter Mengen des Expressionsvektors geringfügig geringer als die in LMP7_E2_Q-transfizierten Zellen. Der POMP-Gehalt war in allen LMP7_E2-transfizierten Zellen unabhängig von cotransfiziertem LMP7_E1 ungefähr gleich (Spur 2-6). Eine verstärkte Detektion von POMP konnte nur in den ausschließlich LMP7_E1-transfizierten Zellen erfolgen (Spur 1), was mit bereits beschriebenen Experimenten korreliert (vgl. Abbildung 27). Auch eine genauere Analyse der verschiedenen Transfektanten anhand der Verteilung in Dichtegradientenfraktionen bezüglich POMP sowie den unprozessierten und maturierten Formen von LMP2 bzw. LMP7 konnte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den LMP7_E2-Transfektanten (2-6) aufzeigen. Somit konnte keine wesentliche Veränderung der Expression dieser Proteine in Abhängigkeit von der LMP7_E2-Variante bzw. von cotransfiziertem LMP7_E1 beobachtet werden.

3.2.8 Wie wird die schnellere Immuno-Assemblierung gewährleistet?

Die Tatsache, dass Immunoproteasomen schneller maturieren als die konstitutiven Komplexe (s. Kapitel 3.2.2), warf weitere Fragen hinsichtlich der Regulation der Expression einzelner proteasomaler Untereinheiten auf. Die Formation von Immunoproteasomen verläuft ausschließlich *de novo* über eine Neusynthese aller Untereinheiten und anschließender Assemblierung von Precursorkomplexen. Ist die Maturierung von Immunoproteasomen beschleunigt, werden pro Zeiteinheit mehr Partikel formiert. Dies bedeutet aber auch, dass mehr Untereinheiten dafür bereitgestellt werden müssen. Im Gegensatz zu den aktiven Immunountereinheiten wurde bisher eine verstärkte Expression infolge der Cytokin-Stimulation allerdings weder für die anderen, inaktiven β - noch für die α -Untereinheiten gezeigt. Es wurde sogar davon ausgegangen, dass z.B. die α -Untereinheiten unabhängig vom Cytokin-Stimulus konstant exprimiert werden und sich deshalb als interner Standard z.B. in *Northern Blot*-Analysen eignen. Eine weitere Möglichkeit, dieses Fließgleichgewicht zumindest für einen kurzen Zeitraum aufrecht zu erhalten, ist eine Bereitstellung einer ausreichend großen Menge dieser Untereinheiten in schon vorhandenen Precursorkomplexen. Wie in Kapitel 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben, existieren putative frühe Assemblierungsintermediate. Diese könnten u.U. als Quelle für jene Untereinheiten, die in ihrer Expression nicht beeinflusst werden, aber für eine Assemblierung von Immunoproteasomen unabdingbar sind, dienen. Somit könnte die beschleunigte Immunoproteasom-Assemblierung dadurch ermöglicht werden, dass in unstimulierten Zellen quantitativ mehr frühe Precursorkomplexe gebildet werden, als für die

langsamere, konstitutive Proteasombiogenese benötigt werden. Verbleibt dieses über den Bedarf hinausgehende Kontingent wenigstens zeitweise in der Zelle, könnte diese (zumindest anfänglich) schnell auf einen externen Cytokinstimulus reagieren, indem ausschließlich die induzierbaren Immununtereinheiten neu synthetisiert werden und in die vorassemblierten Komplexe inkorporiert werden müßten. Wäre dies der Fall, müßte zumindest in nur kurzzeitig stimulierten HeLa-Zellen eine Abnahme der frühen Precursorkomplexe zu beobachten sein, da diese vermehrt zu aktiven Immunoproteasomen heranreifen. Zu diesem Zweck wurden Immunoblots (analog zu denen in Abbildung 14 gezeigten) auf Saccharose-Dichtegradienten-Fractionen von Lysaten kurzzeitig IFN γ -stimulierter HeLa-Zellen angefertigt. Wie Abbildung 33 zeigt, konnten in HeLa-Zellen bereits nach einem sehr kurzen IFN γ -Stimulus von 4h sowohl unprozessiertes, als auch maturiertes LMP7 (β 5i) detektiert werden. Deren Intensität nahm während der Stimulationszeit (bis zu 16h) weiter zu. Wie anhand des Gradienten-Immunoblots gegen LMP7 (Abbildung 33, rechts) nachgewiesen wurde, wurde LMP7-Protein nach einer 10stündigen IFN γ -Stimulation stark induziert und lag bereits in reife Immunoproteasomen inkorporiert vor.

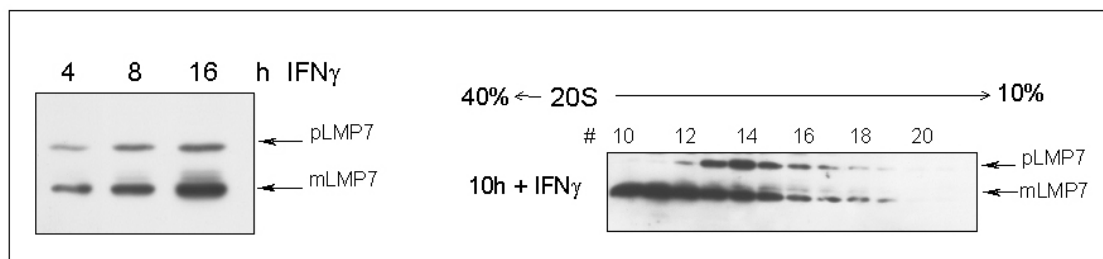


Abbildung 33: Die Expression und Maturierung von LMP7 ist abhängig von der Dauer der IFN γ -Stimulation der Zellen. HeLa-Zellen wurden nach einer Dauer von 4, 8, 10 bzw. 16 Stunden der IFN γ -Stimulation (150U/ml) lysiert und je 50 μ g Gesamtlisat im Immunoblot auf die Expression von LMP7 analysiert (links). Bereits nach 4h wurde sowohl die Proform [p] als auch reifes [m] LMP7 (β 5i) detektiert, beide Formen nehmen über einen Zeitraum bis zu 16h weiter zu. Durch IFN γ induziertes LMP7 kann nach 10h Stimulation in Immunoblots auf Saccharose-Dichtegradienten-Fractionen sowohl hauptsächlich in reifen 20S-Fractionen (# 8- 10) als auch in 16S-Precursorfraktionen (#12-14) nachgewiesen werden.

Konzentriert zu dieser Induktion an Immunoproteasomen und Immuno-Precursorkomplexen konnte auch eine geringfügige Abnahme der frühen Assemblierungsintermediate (*early proteasome intermediates*, 'EPIs'), exemplarisch gezeigt an den Untereinheiten α 5 und α 6, nachgewiesen werden (Abbildung 34). Um mögliche Zellzyklus-abhängige Effekte der Expression auszuschließen, wurden zu jedem Zeitpunkt auch die entsprechenden unstimulierten Zellen analysiert. Die humane Untereinheit α 5 war nach einem Stimulationszeitraum von 8h vor allem in den 13S-Precursor-Fractionen (ca. # 15-17) geringer zu detektieren als im entsprechenden Kontrollgradienten. In Fraktionen geringerer Dichte, in denen die 'EPIs' sedimentieren, war zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen auszumachen. Nach einem Stimulationszeitraum von 10h war hingegen auch eine eindeutige Abnahme von α 5 in diesen sehr leichten Fraktionen (# 18-21) festzustellen. Nach der gleichen

Stimulationsdauer konnte auch für $\alpha 6$ eine geringere Intensität in den 16S- und 13S-Precursorfraktionen im Vergleich zum Kontrollgradienten beobachtet werden. Nur in den Mono- bzw. Dimerfraktionen schien geringfügig mehr $\alpha 6$ im Gradienten der stimulierten Zellen zu sedimentieren als in der Kontrolle. Nach 16h näherte sich zumindest für $\alpha 5$ die Intensität in allen Prä-20S-Fractionen wieder der der Kontrollzellen an, evtl. erschien sogar ein leichter Überschuß in den putativen 16S-Precursorfraktionen. Dies könnte damit zu erklären sein, dass sich zu diesem Zeitpunkt die Expression aller für die Immuno-Proteasom-Biogenese erforderlichen Untereinheiten auf die höhere Assemblierungsrate eingestellt hatte und nun wieder ausreichend vorassemblierte Komplexe in der Zelle vorlagen. Deshalb wurde analysiert, ob die Expression der konstitutiven 20S-Untereinheiten nicht zumindest kurzzeitig doch erhöht wurde, um der Abnahme freier bzw. Precursor-inkorporierter Untereinheiten entgegenzuwirken, die durch die beschleunigte Immunoproteasom-Maturierung hervorgerufen wurde. Hierfür wurde sowohl aus kurzzeitig (8h) $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten als auch aus nicht stimulierten Kontroll-Zellen Gesamt-RNA gewonnen und mittels semiquantitativen RT-PCR-Experimenten die Transkriptmenge verschiedener 20S-Komponenten abgeschätzt. Für keine der analysierten proteasomalen α - bzw. inaktiven β -Untereinheiten konnte eine differentielle mRNA-Expression nach einem kurzzeitigen $\text{IFN}\gamma$ -Stimulus nachgewiesen werden.

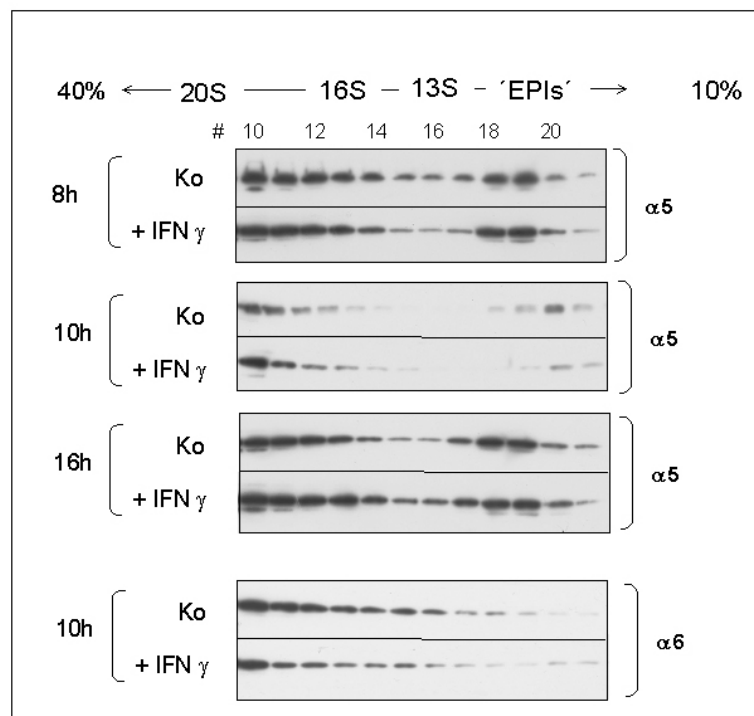


Abbildung 34: Eine kurzzeitige $\text{IFN}\gamma$ -Exposition von HeLa-Zellen führt zu einer geringen, transienten Verminderungen von frühen Precursorkomplexen in leichten Dichtegradientenfraktionen, exemplarisch gezeigt an $\alpha 5$ und $\alpha 6$. In frühen Zeiträumen der $\text{IFN}\gamma$ -Exposition (+ $\text{IFN}\gamma$, 8h bzw. 10h) nehmen die Intensitäten von $\alpha 5$ und $\alpha 6$ in Fraktionen der 13/16S-Precursor sowie der frühen Assemblierungsintermediate ('EPIs') im Vergleich zu den entsprechenden nichtstimulierten Kontrollzellen (Ko) ab. Nach 16h ist keine Dezimierung an $\alpha 5$ -haltigen Precursorkomplexen in stimulierten Zellen verglichen mit der Kontrolle mehr zu beobachten.

3.3 Die Stabilität humaner 20S-Proteasomen

Wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, maturieren Immunoproteasomen intrinsisch schneller als konstitutive 20S-Proteasomen, also unabhängig von weiteren, IFN γ -induzierten Faktoren. Somit werden in IFN γ -stimulierten Zellen mehr reife Partikel pro Zeiteinheit formiert als in unstimulierten. Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob die Stabilität der bereits vor dem IFN γ -Stimulus existenten 20S-Partikel durch die Cytokin-Behandlung beeinflusst wird. Eine Homöostase des Gesamthaushaltes an 20S-Proteasomen würde bedingen, dass mit der beschleunigten Immunoproteasom-Formation eine verringerte Stabilität prä-existenter, konstitutiver 20S-Proteasomen einhergeht. Keine der bisher publizierten Arbeiten zur Stabilität von *mammalia* 20S-Proteasomen unterschied allerdings zwischen konstitutiven und Immunoproteasomen (s. Kapitel 1.7). Auch wurde bisher nicht untersucht, ob sich die ermittelte Stabilität konstitutiver 20S-Proteasomen evtl. unter dem Einfluß äußerer Stimuli wie IFN γ ändert. Deshalb sollten anhand von *Pulse Chase*-Experimenten die womöglich unterschiedlichen Stabilitäten sowohl von konstitutiven 20S-Proteasomen unter verschiedenen Bedingungen (wie fehlende oder induzierte Immunoproteasom-Biogenese) als auch von Immunoproteasomen bestimmt werden.

3.3.1 Der selektiv antiproliferative Effekt von IFN γ

Da 20S-Proteasomen stabile Komplexe mit langen Halbwertszeiten darstellen (s. Kapitel 1.7), wurden modifizierte, sog. *long-term Pulse-Chase* Experimente mit extensiven *chase*-Zeiträumen (bis zu 5 Tage) durchgeführt. Um den Einfluß von IFN γ auf die 20S-Stabilitäten zu untersuchen, mussten demnach die Zellen nach der metabolischen Markierung und einer 24stündigen Stimulation noch mindestens vier weitere Tage kultiviert werden. Da dem Cytokin antiproliferative und proapoptotische Eigenschaften zugeschrieben werden, mußte zunächst kontrolliert werden, ob die ausgewählten Zelllinien über den geplanten Zeitraum von IFN γ unabhängige Proliferationsraten aufweisen. Dies wurde mittels der sog. *Cell Cycle Tracking*-Methode untersucht, die auf der stabilen Markierung von zellulären Proteinen mit einem fluoreszierenden Farbstoff (CFDA-SE) basiert. Die fluoreszierenden Konjugate sind über einige Wochen stabil und werden bei einer Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben, was eine Verfolgung der Zellteilung über längere Zeiträume mittels FACS-Analyse erlaubt (s. Kapitel 2.13.4.2).

Wie in Abbildung 35 gezeigt, wurde in T2-Zellen durch einen 24stündigen IFN γ -Stimulus keine Wachstumshemmung ausgelöst. Nach einer Zeitspanne von vier Tagen im Anschluß an die Stimulation wiesen die Cytokin-behandelten Zellen gleiche Fluoreszenzintensitäten wie die unbehandelten Kontrollzellen auf. T2-Zellen proliferierten in dem gewählten Zeitfenster demnach unbeeinflusst von einem IFN γ -Stimulus. Auch die stabil LMP2/LMP7-transfizierte T2-Zelllinie (T2 LMP2+7) zeigte keine IFN γ -induzierte Wachstums-Inhibition.

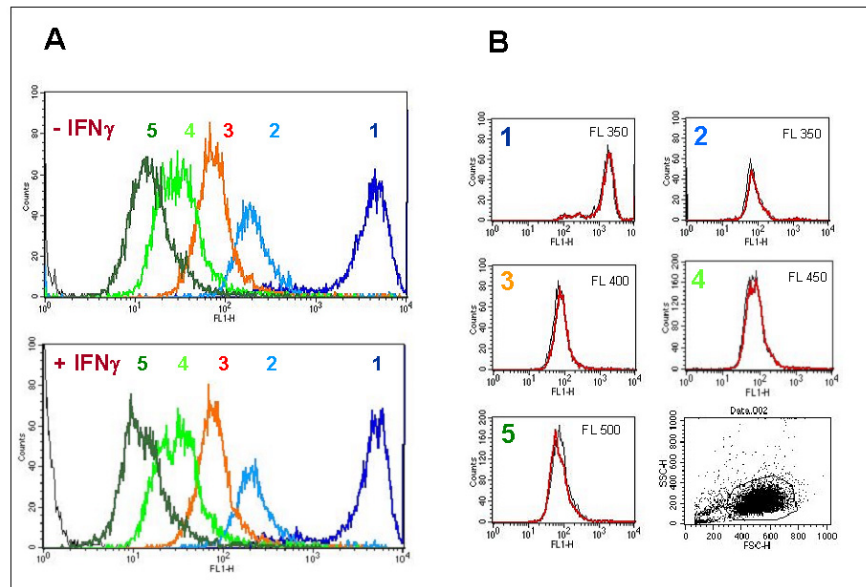


Abbildung 35: In T2-Zellen wird durch einen 24stündigen IFN γ -Stimulus keine Wachstumshemmung ausgelöst. In einem 'Cell Cycle Tracking' Experiment wurden T2-Zellen entweder im Vollmedium (-IFN γ) kultiviert bzw. 24h mit IFN γ stimuliert (+IFN γ). Anschließend wurden die Zellen mit CFDA-SE markiert und sukzessive die Fluoreszenz der stabil gefärbten Zellen bestimmt, wobei Zeitpunkt 1 (dunkelblau) direkt nach der Markierung (und somit direkt nach Ende der Stimulationsdauer) aufgenommen wurde und jeder weitere je 24h später. A zeigt die CFDA-SE-Profile aller Meßpunkte für unstimulierte [-IFN γ] bzw. stimulierte T2-Zellen [+IFN γ], wobei die angeschnittene schwarze Linie am linken Rand nicht gefärbte Zellen widerspiegelt. In B sind die Fluoreszenzen zu den einzelnen Zeitpunkten für unstimulierte [-IFN γ , schwarz] und stimulierte Zellen [+IFN γ , rot] überlagert.

In T2-Zellen wurde durch IFN γ sowohl die mRNA als auch das Protein POMP induziert (vgl. Abbildung 22). Dies deutete auf einen funktionellen IFN γ -Signaltransduktionsweg hin. Einen eindeutigen Beleg dafür sollte die Analyse weiterer IFN γ -stimulierbarer Proteasom-Komponenten erbringen.

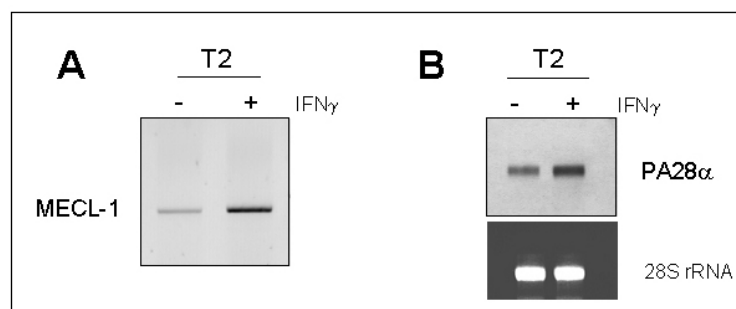


Abbildung 36: In T2-Zellen ist der IFN γ -Signaltransduktionsweg für MECL-1 und PA28 funktionell. T2-Zellen wurden unter Ab [-] bzw. Anwesenheit [+IFN γ] des Cytokins kultiviert. Die mRNA der Immununtereinheit MECL-1 wird durch IFN γ induziert (semiquantitative RT-PCR, A). Der Northern Blot auf normierte Gesamt-RNA-Mengen zeigt eine eindeutige Induktion der mRNA des Proteasom-Aktivators PA28 α in stimulierten T2-Zellen (B).

Aufgrund genomischer MHC II-Locus Deletion sind T2-Zellen LMP2- und LMP7-defizient (s. Kapitel 3.2.6), weswegen die nicht dort codierten IFN γ -induzierbaren Komponenten MECL-1 ($\beta 2i$) und PA28 α untersucht wurden. Die RT-PCR-Analyse bezüglich MECL-1 bzw. die *Northern Blot*-Analyse bezüglich PA28 α zeigten eine signifikante Induktion beider Transkripte durch IFN γ auf (Abbildung 36). Somit wurde belegt, dass T2-Zellen prinzipiell auf einen IFN γ -Stimulus reagieren, dieser jedoch keinen antiproliferativen Einfluß auf die Zellen ausübt.

Im Gegensatz dazu wirkte sich ein 24stündiger IFN γ -Stimulus auf konfluente HeLa-Zellen moderat wachstums-inhibierend aus (Abbildung 37). Die stimulierten Zellen wiesen nach fünf Tagen eine höhere Fluoreszenzintensität auf als die unstimulierten Kontrollzellen, was einer niedrigeren Proliferationskinetik der behandelten Zellen entspricht. Dieser Effekt war ausschließlich auf den Einfluß von IFN γ und nicht auf eine mögliche Kontaktinhibition der konfluent wachsenden Zellen zurückzuführen, da dieser Versuch mehrere Ansätze mit unterschiedlichen Ausgangszelldichten umfasste. Unabhängig von der Zelldichte zeigte sich einheitlich eine reduzierte Proliferationsrate von stimulierten HeLa-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Noch drastischer wirkte sich IFN γ auf das Wachstum von Suspensions-adaptierten HeLa S3-Zellen aus (Abbildung 38). Dort war nicht nur das Proliferation der stimulierten Zellen wesentlich beeinträchtigt. Auch die Anzahl der vitalen Zellen einer Fluoreszenzintensität (Festlegung in der FACS-Analyse durch *gating* im *Dot Plot* von FSC/SSC) nahm bei stimulierten Zellen mit Zunahme der Kulturdauer signifikant ab. So konnte nach fünf Tagen nur die Hälfte an fluoreszierenden Zellen in der stimulierten Probe im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Dieser Befund wurde auch durch Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau verifiziert.

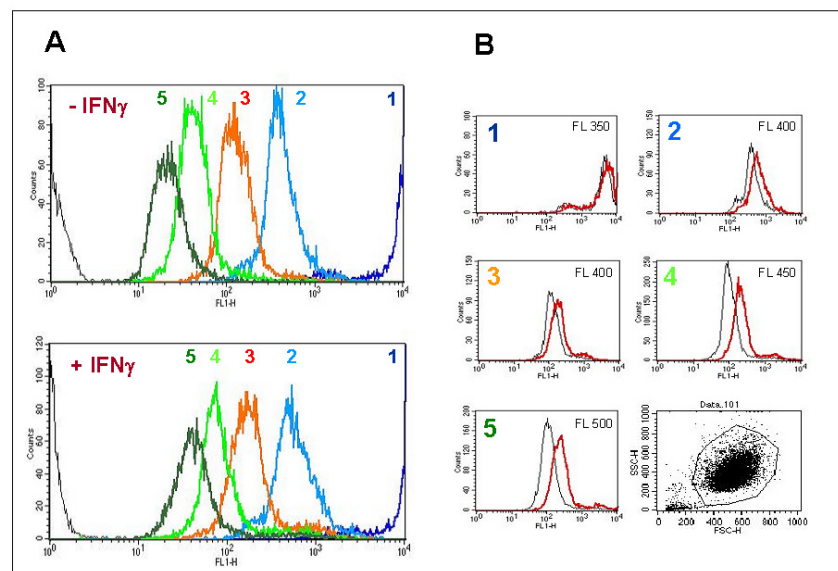


Abbildung 37: HeLa-Zellen zeigen nach einem 24stündigen IFN γ -Stimulus eine moderate Proliferations-Inhibition über einen Zeitraum von fünf Tagen. Erläuterung vgl. Abbildung 35.

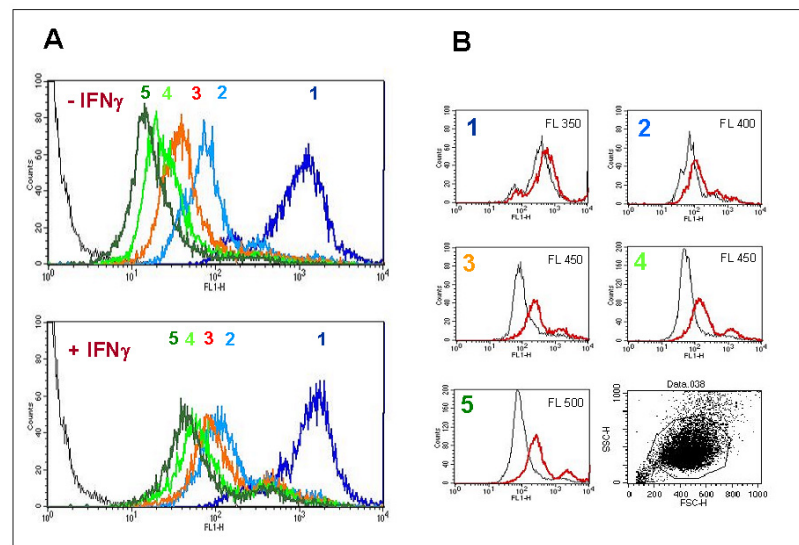


Abbildung 38: IFN γ übt einen starken antiproliferativen Effekt auf Suspensions-adaptierte HeLa S3-Zellen aus. Erläuterung vgl. Abbildung 35.

3.3.2 Immunoproteasomen sind labiler als konstitutive 20S-Proteasomen

Bei kurzfristigen *Pulse Chase*-Experimenten erfolgte die Normierung des eingesetzten Proteinlysates für die Immunpräzipitation über die Messung inkorporierter ³⁵S-Aktivität (Scintillation, s. Kapitel 2.12.2.3). Dies ermöglichte einen Ausgleich von möglicherweise nicht exakt identischen Protein-Markierungsraten in verschiedenen Proben und einen Einsatz gleicher Gesamtaktivitäten (DPM) für die Immunpräzipitation. Dieser methodische Ansatz ist für *long-term Pulse-Chase*-Experimente zur Ermittlung langer Halbwertszeiten ungeeignet. ³⁵S-Methionin wird während des *Pulse* sowohl in langlebige als auch mehrheitlich in kurzlebige Proteine eingebaut. Nach einer langen *chase*-Zeit ist allerdings der Anteil markierter, kurzlebiger Proteine drastisch reduziert und die zu messende Aktivität repräsentiert vornehmlich langlebige Proteine, wie das 20S-Proteasom. Gleiche Mengen an ³⁵S-Aktivität entsprechen somit direkt nach dem *Pulse* anteilig eher wenig markiertem, langlebigem Protein (Proteasom), nach einer langen *chase*-Dauer allerdings ausschließlich. Folglich ist bei *long-term Pulse Chase*-Experimenten eine andere Methode der Normierung angebracht. T2- bzw. T2 LMP2/7-Zellen, die in ihrem Wachstum unabhängig von IFN γ waren, wurden deshalb in einer Gesamtpopulation metabolisch ³⁵S-markiert, im Anschluß gesplittet und erst nachfolgend je ein Kontigent der Zellen mit IFN γ stimuliert bzw. in Vollmedium belassen. Dies schloss unterschiedliche Markierungsraten der Zellen aus. Für die Immunpräzipitation konnten somit gleiche Volumina des Proteinlysates der Zellen (ausgehend von identischen Zellmengen je Probe zu Beginn des *Chase*) eingesetzt werden. Das Autoradiogramm von spezifisch immunpräzipitierten konstitutiven 20S-Komplexen aus T2- bzw. Immunoproteasomen aus T2 LMP2+7-Zellen zeigt Abbildung 39.

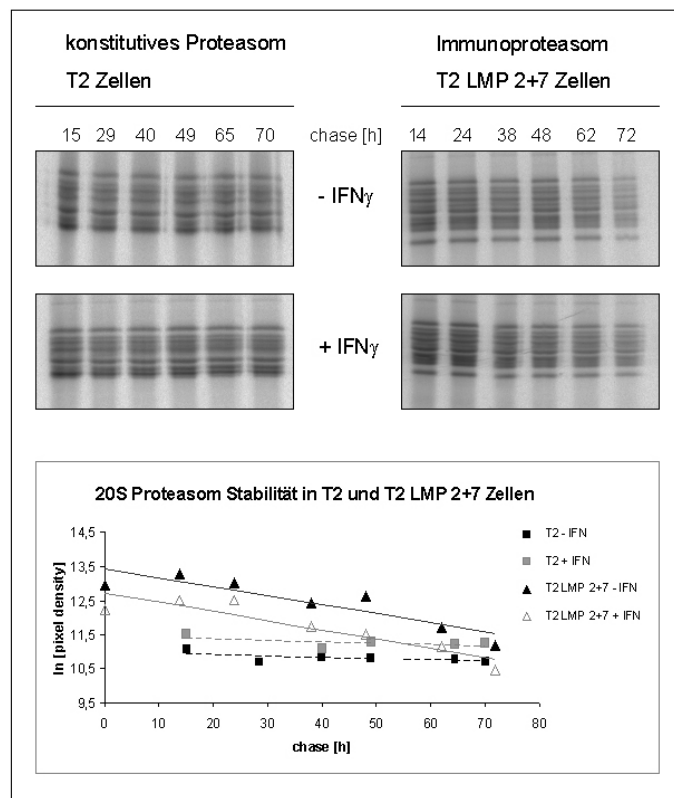


Abbildung 39: Immunoproteasomen sind fünffach instabiler als konstitutive 20S-Proteasomen, beider Stabilitäten sind unbeeinflusst von einem IFN γ -Stimulus der Zellen. T2- bzw. T2 LMP2+7-Zellen wurde metabolisch ^{35}S -markiert. Anschließend wurde je eine Subpopulation der Zellen in Vollmedium kultiviert [-IFN γ] bzw. 24h Cytokin-stimuliert [+IFN γ]. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (*chase* bis zu 72h) wurden die Zellen lysiert. Mittels 20S-spezifischem Antikörper [MP3] wurde konstitutives 20S-Proteasom (T2) bzw. Immunoproteasom (T2 LMP2+7) immunpräzipitiert. Die Autoradiogramme mit zugehöriger Quantifizierung sind abgebildet. Fünf unabhängige Experimente (mit jeweiligen Doppelwerten) ergaben eine ca. fünffach reduzierte Stabilität von Immunoproteasomen im Vergleich zu konstitutiven 20S-Komplexen unabhängig von einer IFN γ -Behandlung der Zellen.

Die Quantifizierung von fünf voneinander unabhängigen Experimenten (mit jeweiligen Doppelwerten und *chase*-Zeiträumen bis zu 110h) ergab eine signifikant verminderte Halbwertszeit von Immunoproteasomen (ca. 27h [1d]) im Vergleich zu konstitutiven 20S-Komplexen (ca. 133h [5.5d]). Dies entspricht einer fünffachen Abbaurate der Immunokomplexe im Vergleich zum Standardproteasom. Die Stabilität beider Komplexe war absolut unabhängig von einem IFN γ -Stimulus der Zellen.

3.3.3 Die Stabilität des konstitutiven 20S-Proteasoms ist unabhängig von der Immunoproteasom-Biogenese

In T2-Zellen wurde die Stabilität von konstitutivem 20S-Proteasom als unabhängig von IFN γ charakterisiert (s. 3.3.2). Ein Cytokin-Stimulus resultierte in diesen MHC II-Locus-deletierten Zellen aber nicht in einer Induktion der Immunoproteasom-Formation. Um zu untersuchen, ob

sich die Stabilität bereits formierter 20S-Proteasomen möglicherweise ändert, wenn eine Immunoproteasom-Biogenese durch $\text{IFN}\gamma$ induziert wurde, wurden analoge *long-term Pulse-Chase*-Experimente mit HeLa-Zellen durchgeführt. Das Cytokin wirkte deutlich antiproliferativ auf HeLa-Zellen (s.3.3.1). Aufgrund der durch $\text{IFN}\gamma$ reduzierten Proliferationsrate von stimulierten HeLa-Zellen konnte eine Normierung nicht einfach durch die Aussaat einheitlicher Zellmengen zu Versuchsbeginn wie bei T2-Zellen angenähert werden. Hier musste das in der Immunpräzipitation einzusetzende Proteinlysate über eine Protein-Konzentrationsbestimmung normiert werden, in der Annahme, dass gleiche Mengen an Gesamtproteinlysate näherungsweise der gleichen Zellzahl entsprachen. Auch wenn das natürlich nicht berücksichtigte, in welchem Zustand sich die Zellen befanden, erlaubte dies eine Abschätzung, ob sich die Stabilität der 20S-Proteasomen durch die Induktion der Immunoproteasom-Biogenese wesentlich ändert. Wie in Abbildung 40 dargestellt, konnte keine signifikante Beeinflussung der Stabilität von konstitutiven 20S-Komplexen durch die Immunoproteasom-Induktion in HeLa-Zellen beobachtet werden. Vier unabhängige Experimente (jeweilige Doppelwerte und *chase*-Zeiträume bis zu 110h) sowohl mit konfluenten HeLa-Zellen als auch mit Suspensionszellen (HeLaS3) ergaben folgende gemittelte Halbwertszeiten: 49h für konstitutive 20S-Proteasomen in unstimulierten Zellen und 43h für konstitutive 20S-Proteasomen in $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten HeLa-Zellen. Diese geringfügige Veränderung ist vor allem aufgrund der bereits erwähnten experimentell bedingten Ungenauigkeiten (durch veränderte Proliferationsraten der Zellen nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation) als nicht signifikant einzuschätzen.

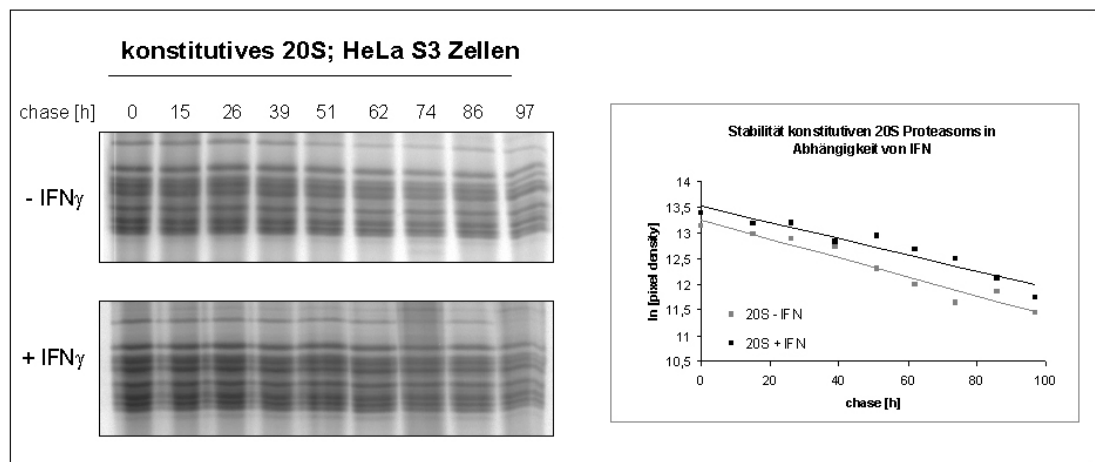


Abbildung 40: Die Induktion der Immunoproteasom-Biogenese durch $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation von HeLaS3-Zellen wirkt sich nicht signifikant auf die Stabilität prä-existenter konstitutiver 20S-Proteasomen aus. Nach der metabolischen ^{35}S -Markierung nicht stimulierter HeLaS3-Zellen (d.h. konstitutiver 20S-Proteasomen) wurde je eine Subpopulation der Zellen in Vollmedium kultiviert [- $\text{IFN}\gamma$] bzw. 24h Cytokin-stimuliert [+ $\text{IFN}\gamma$]. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (*chase* bis zu 97h) wurden die Zellen lysiert. Mittels 20S-spezifischem Antikörper [MP3] wurde 20S-Proteasom immunpräzipitiert. Die Autoradiogramme mit zugehöriger Quantifizierung sind abgebildet. Vier unabhängige Experimente (mit jeweiligen Doppelwerten) sowohl mit konfluenten als auch mit Suspensionszellen (HeLaS3) zeigten keine signifikante Beeinflussung der Stabilität von konstitutiven 20S-Komplexen durch die Immunoproteasom-Induktion.

4 DISKUSSION

4.1 Initiation der 20S-Proteasom-Assemblierung

4.1.1 Interaction Trap

Da die initialen Schritte, die zur Formation humaner 20S-Proteasomen führen, unbekannt sind (s. Kapitel 1.5.2.2), wurden spezifische Interaktionen zwischen einzelnen humanen 20S-Proteasom-Untereinheiten mittels eines vereinfachten *Yeast Two-Hybrid-Assays* (*Interaction Trap*) charakterisiert (s. Kapitel 2.13.3.1 und 3.1.1). Dass einige der dabei untersuchten Interaktionen nur aufgrund des prototrophen Wachstums konstatiert, aber nicht im β -Galactosidase-Nachweis bestätigt werden konnten, liegt im Genotyp des genutzten *S.cerevisiae*-Stammes begründet (s. Kapitel 2.13.3.1). Prototrophes Wachstum, aber fehlende β -Galactosidase-Aktivierung in diesem hierarchisch angelegten Experiment sind somit weder ein Ausschlußkriterium, noch eine Bestätigung einer möglichen Interaktion. Umgekehrt bedeutet die Stringenz des *colony-lift filter assays* aber auch, dass vor allem die Interaktionen, die durch eine intensive Blaufärbung als sehr stark beurteilt wurden, wirklich eingegangen werden, insbesondere wenn sie durch die reziproke Kombination der Bindungspartner bestätigt wurden. Ein weiterer kritischer Punkt des Hefe 2-Hybrid-Assays ist die Möglichkeit, dass durch die N-terminalen Fusionen der Proteine mit GAL4_BD/AD mögliche Interaktionen sterisch beeinflusst werden. So könnten z.B. Faltungsveränderungen Interaktionsstellen maskieren oder trotz Interaktion könnte die räumliche Nähe nicht ausreichen, einen funktionellen Transkriptionsaktivator zu generieren. Der schwerwiegendste Mangel dieses Assays ist allerdings, dass immer nur zwei Bindungspartner untersucht werden können. Dies kann dazu führen, dass für die 20S-Assemblierung essentielle Interaktionen nicht aufgezeigt werden könnten, weil sie möglicherweise erst in Oligomerstrukturen ausgebildet werden, indem potentielle Interaktionsstellen erst durch die sterische Beeinflussung im Komplex von mehreren Untereinheiten exponiert werden. Weiterhin bedeutet dies aber auch, dass Bindungen, die anhand von Hefe 2-Hybrid-Studien postuliert werden, im Oligomer-Kontext gar nicht von Bedeutung sein könnten. So könnten alle 'unerwarteten' Interaktionen zwischen Untereinheiten, die im 20S-Proteasom nicht benachbart sind, in der ähnlichen Struktur der sequenzverwandten Komponenten begründet liegen, aber während der Assemblierung gar nicht zum Tragen kommen. Somit muß überprüft werden, ob putative Interaktionen, die nur in möglichen Precursorkomplexen die 20S-Assemblierung unterstützen könnten, aber im reifen 20S-Proteasom nicht mehr in räumlicher Nähe liegen [wie z.B. $\alpha 4$ - $\alpha 7$ (Apcher, et al., 2004)], überhaupt existieren.

Die Interpretation der nachgewiesenen Interaktionen zwischen einzelnen humanen Proteasom-Komponenten und eine Gegenüberstellung zu analogen, bereits publizierten Hefe 2-Hybrid-Studien wurde bereits in Kapitel 3.1.1 vorgenommen (vgl. Abbildung 42, Anhang). In

Abbildung 41 sind die nachgewiesenen Interaktionen schematisch dargestellt. Dabei symbolisieren schwarze Pfeile Bindungen, die durch mindestens eine publizierte Hefe 2-Hybrid-Studie gestützt und Doppelpfeile Interaktionen, die auch in der reziproken Kombination beider Bindungspartner belegt wurden. Interaktionen, die erstmals aufgrund des hier durchgeführten *Interaction Trap*-Experimentes beschrieben wurden, sind in Abbildung 41 durch blaue Pfeile symbolisiert. Das prototrophe Wachstum der $\alpha 6 + \beta 6$ -Doppeltransformante in beiden Kombinationen weist auf eine möglicherweise schwache Bindung, die den α - β -Interringkontakt stützen könnte, hin. Der auch durch mehrere Publikationen bestätigte β - β -Interringkontakt zwischen $\beta 3$ und $\beta 5$ [eigene Daten und (Cagney, et al., 2001; Jayarapu and Griffin, 2004)] konnte hier erstmals auch für das Immunoproteasom gezeigt werden. Die $\beta 3 - \beta 5i / LMP7$ - Interaktion wurde durch prototrophes Wachstum in beiden Kombinationen und, in einer Kombination, durch die Blaufärbung im Filterassay angezeigt. Die bisher nicht beschriebene, aber in der vorgelegten Arbeit als stark charakterisierte Interaktion zwischen dem Maturierungsfaktor POMP und der Immunountereinheit $\beta 5i / LMP7$ wurde näher untersucht. Auch biochemische Interaktionsexperimente (s. Kapitel 3.1.2) verifizierten, dass POMP sowohl an die konstitutive Untereinheit $\beta 5 / MB1$ als auch an die homologe Immunountereinheit $\beta 5i / LMP7$ bindet. Somit bestehen keine generellen Unterschiede in der Interaktion des humanen Maturierungsfaktors mit den aktiven Untereinheiten von konstitutiven bzw. von Immunoproteasomen.

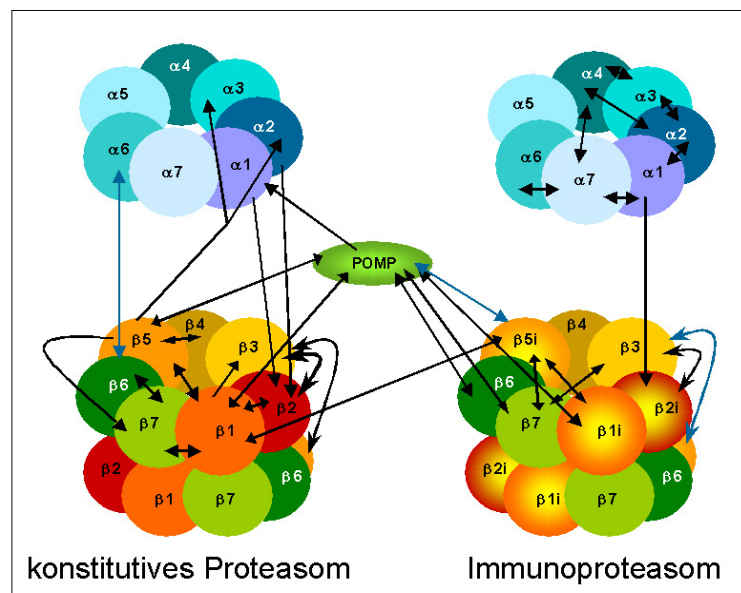


Abbildung 41: Interaktionen zwischen einzelnen 20S-Proteasom-Komponenten verschiedener Spezies, die anhand von Hefe 2-Hybrid-Analysen ermittelt wurden (vgl. auch Abbildung 42, Anhang). Schwarze Pfeile symbolisieren Interaktionen zwischen zwei proteasomalen Untereinheiten, die durch mindestens zwei *Yeast 2-Hybrid-Screens* beschrieben wurden [human: vorgelgte Daten und (Jayarapu and Griffin, 2004); *C.elegans* (Davy, et al., 2001); *S.cerevisiae* (Cagney, et al., 2001)]. Pfeile an beiden Enden symbolisieren eine Interaktion auch in der reziproken Kombination beider Interaktionspartner. Blaue Pfeile symbolisieren Interaktionen, die erstmalig in der vorgelegten Arbeit beschrieben wurden.

4.1.2 Putative frühe proteasomale Assemblierungsintermediate

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit konnte eine Methode etabliert werden, frühe proteasomale Assemblierungsintermediate (*early proteasomal intermediates* 'EPIs') aus humanen Zellen anzureichern. Die isolierten EPIs setzten sich reproduzierbar aus drei Subkomplexen mit einer Größe von maximal 200kDa zusammen, die im Immunoblot durch den Proteasom-Antikörper MP3 detektiert werden. Die Analyse einzelner proteasomaler Untereinheiten mittels Immunoblot zeigte, dass $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, (pro-) $\beta 1$, (pro-) $\beta 5$, (pro-) $\beta 6$ sowie POMP in den EPIs vorliegen. Eine genauere Charakterisierung der einzelnen Subkomplexe konnte nicht erfolgen. In wesentlich höherer Abundanz als die proteasomalen Untereinheiten wurden HSP90 und Proteine der 14-3-3-Familie in den EPIs angereichert.

Das Chaperon HSP90 ist auf vielen Ebenen funktionell mit dem UPS gekoppelt. So wurde z.B. nachgewiesen, dass die Stabilität proteasomaler Substrate durch HSP90 moduliert wird (Connell, et al., 2001; Gusarova, et al., 2001; Ishii, et al., 1999). Aufgrund der gemeinsamen Aufreinigungen von 20S-Proteasomen und HSP90 aus unterschiedlichsten Quellen, wurde das Chaperon als möglicher Assoziationspartner des 20S-Proteasoms beschrieben (Ishii, et al., 1999; Montel, et al., 1999; Tsubuki, et al., 1994; Wagner and Margolis, 1995). Die Relevanz und die Funktion der Interaktion zwischen HSP90 und 20S-Proteasomen ist vielschichtig diskutiert worden. HSP90 kann den Verlust des Proteasom-Aktivatorkomplexes PA28 funktionell bei der beschleunigten Antigen-Prozessierung von Ovalbumin kompensieren (Yamano, et al., 2002). Andere Untersuchungen konnten jedoch eine Inhibition ausgewählter Aktivitäten des 20S Proteasoms gegenüber fluorogenen Peptidsubstraten beobachten (Tsubuki, et al., 1994; Wagner and Margolis, 1995). Außerdem soll HSP90 das 20S-Proteasom vor oxidativer Inaktivierung schützen (Conconi, et al., 1998) und die Stabilität des 26S-Komplexes erhöhen (Imai, et al., 2003). Eleuteri *et al.* (2002) zeigten eine direkte Assoziation beider Makromoleküle und eine hohe Stabilität der Komplexe mittels *surface plasmon resonance*-Studien auf. Möglicherweise wird die HSP90-Bindung an den 20S-Komplex durch sog. KEKE-Motive vermittelt. Sowohl HSP90 als auch die proteasomale Untereinheit $\alpha 3$ besitzen ein solches Motiv (Realini, et al., 1994; Realini, et al., 1994). Im Widerspruch dazu steht, dass immunpräzipitierte 20S-Komplexe aus Hitzeschock-behandelten Zellen mit keinen weiteren Proteinen (wie z.B. HSP90) assoziiert vorlagen (Kuckelkorn, et al., 2000).

Proteine der in Eukaryoten hoch konservierten 14-3-3-Familie besitzen selbst keinerlei intrinsische Enzymaktivität (Mackintosh, 2004). Sie binden an spezifisch phosphorylierte Motive diverser Zielproteine (Muslin, et al., 1996). Es wird diskutiert, dass sie dadurch eine Konformationsänderung auslösen oder die Interaktion der Zielproteine mit anderen Bindungspartnern beeinflussen. Die Funktion dieser allosterischen Cofaktoren ist aufgrund der vielfältigen (>300) Zielproteine, die u.a. Multiproteinkomplexe sowie zahlreiche Kinasen bzw. Phosphatasen darstellen können, nur wenig eingegrenzt. Sie sind in intrazelluläre

Signaltransduktions- und Transportvorgänge sowie in die Zellzykluskontrolle involviert. Ihre essentielle Bedeutung belegt der lethale Phänotyp von Mutationen der 14-3-3-Homologe sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *Drosophila* [Review: (Fu, et al., 2000)]. Eine wichtige Funktion von 14-3-3-Proteinen liegt in der Lokalisationskontrolle des Zielproteins, die sowohl ER-Transport als auch den nucleo-cytoplasmatischen *shuttle* umfasst [Review: (Muslin and Xing, 2000)]. So können 14-3-3-Proteine Kernlokalisationssequenzen (NLS) des Zielproteins maskieren und damit dessen nucleären Import beeinträchtigen. Unterstützend dazu können sie intrinsische Kernexportsequenzen (NES) demaskieren, so dass sich die phosphorylierten Zielproteine hauptsächlich im Cytoplasma anreichern (McKinsey, et al., 2001; Merla, et al., 2004; Sekimoto, et al., 2004; Uchida, et al., 2004). Die einzige Korrelation zwischen *mammalia* 20S-Proteasomen und 14-3-3-Proteinen wurde anhand von Immunfluoreszenz-Untersuchungen von Aggresomen-ähnlichen perinucleären *inclusion-bodies* humaner Zellen beschrieben (Waelter, et al., 2001). In diesen Strukturen sind poly-ubiquitinierte, mutierte Huntingtin-Fragmente, 20S- sowie 26S-Proteasomen, verschiedene HSPs und 14-3-3-Proteine akkumuliert. Einen Nachweis der direkten Assoziation von 20S-Proteasomen und 14-3-3-Proteinen in den Aggregaten kann ein solches Immunfluoreszenz-Experiment nicht erbringen.

4.1.2.1 DER PUTATIVE EINFLUSS VON CHAPERONEN UND PHOSPHORYLIERUNGEN AUF DIE 20S-ASSEMBLIERUNG

Die Proteasom-Assemblierung wird in späteren Stadien durch Chaperone wie HSP70 unterstützt [s. Kapitel 1.5.3, (Schmidt, et al., 1997; Schmidtke, et al., 1997)]. Möglicherweise könnte auch die Initiation der Proteasom-Formation von der Assistenz verschiedener Chaperone wie HSP90 bzw. 14-3-3 abhängen, was in dem folgenden, hypothetischen Modell resultieren könnte. Eine funktionelle 'Plattform', bestehend aus einzelnen proteasomalen Untereinheiten, Chaperonen und allosterischen Cofaktoren, könnte dabei die Konformation der 20S-Untereinheiten beeinflussen und somit deren Oligomerisierung begünstigen. Zumindest die in den isolierten Assemblierungsintermediaten nachgewiesene α 3-Untereinheit könnte mit HSP90 über beider KEKE-Motive interagieren (Realini, et al., 1994). Weiterhin könnten HSP90 und 14-3-3 verschiedene Kinasen rekrutieren, da beide Proteine nachweislich mit solchen Enzymen interagieren [Reviews: (Fu, et al., 2000; Sreedhar, et al., 2004)]. In früheren Studien wurde für die Proteasom-Assemblierung ein möglicher Zusammenhang mit der Phosphorylierung einzelner proteasomaler Untereinheiten diskutiert (Tanaka, et al., 1992; Tanaka, et al., 1990; Yang, et al., 1995). Yang *et al.* (1995) beobachteten eine verzögerte Prozessierung von Immuno-Precursorkomplexen durch den Phosphatase-Inhibitor Okadainsäure. Somit könnte die Maturierung zu reifen (Immuno)Proteasomen eine Dephosphorylierung von ausgewählten Komponenten des Precursorkomplexes, die demnach vorher phosphoryliert vorlagen, erfordern. Direkt nachgewiesen wurden Phosphorylierungen bisher für alle α -Untereinheiten außer α 1 sowie für β 2 und β 6, allerdings ausschließlich in

reifen 20S-Proteasomen verschiedener Spezies wie *S. cerevisiae*, *C. albicans*, Ratte und Mensch (Castano, et al., 1996; Claverol, et al., 2002; Fernandez Murray, et al., 2002; Iwafune, et al., 2002; Ludemann, et al., 1993; Mason, et al., 1996; Wehren, et al., 1996). Verschiedene Daten belegen, dass proteasomale Untereinheiten zumindest *in vitro* von der Casein Kinase II (CK2) phosphoryliert werden (Castano, et al., 1996; Fernandez Murray, et al., 2002; Ludemann, et al., 1993; Umeda, et al., 1997). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass in humanen Thrombozyten HSP90 u.a. mit CK2 komplexiert vorliegt (Suttitanamongkol, et al., 2002). Dass die Phosphorylierung proteasomaler Untereinheiten schon zum Zeitpunkt der Assemblierung durch HSP90 vermittelt werden könnte, ist somit zumindest nicht auszuschließen. Die in der putativen 'Plattform' ebenfalls komplexierten 14-3-3-Proteine könnten aufgrund ihrer Eigenschaft, spezifisch an phosphorylierte Motive ihrer Zielproteine zu binden, einzelne phosphorylierte Untereinheiten stabilisieren und so ebenfalls deren weitere Oligomerisierung begünstigen. In den isolierten EPIs konnten ausschließlich α -Untereinheiten nachgewiesen werden, die potentiell phosphoryliert werden, so $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$. Auch für die nachgewiesene $\beta 6$ -Untereinheit wurde eine mögliche Phosphorylierung beschrieben (Wehren, et al., 1996).

In den isolierten EPIs wurden die proteasomalen Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 1$, $\beta 5$, $\beta 6$ sowie POMP detektiert. Deren Komplexierung könnte anhand der proteasomalen Protein-Protein-Interaktionen erklärt werden, die mittels der *Interaction Trap*-Experimente ermittelt wurden (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 41). $\beta 1$ interagiert mit $\beta 5$, beide Proteine binden an POMP. Der Maturierungsfaktor wiederum könnte $\beta 6$ rekrutieren. Zwischen den α -Untereinheiten wurden folgende Bindungen eingegangen: $\alpha 3$ - $\alpha 4$, $\alpha 6$ - $\alpha 7$, $\alpha 4$ - $\alpha 7$. Humanes $\alpha 5$ interagiert in humanen Hefe 2-Hybrid-Experimenten mit keiner der anderen Untereinheiten reproduzierbar und in der reziproken Kombination [eigene Daten und (Jayarapu and Griffin, 2004)]. Eine Rekrutierung von $\alpha 5$ in die EPIs könnte jedoch andere Bedingungen erfordern, die im Experiment nicht berücksichtigt wurden, so z.B. die Bindung an HSP90 oder 14-3-3. Auch ist es möglich, dass $\alpha 5$ zwar ausschließlich über die Interaktion mit proteasomalen Proteinen in EPIs dirigiert wird, aber diese Bindung eine Phosphorylierung oder eine Oligomerisierung der anderen, schon vorhandenen Untereinheiten, erfordert. Dem α - β -Dimer-Modell der Assemblierungsinitiation folgend könnten in den EPI-Subkomplexen auch schon α - β -Interaktionen eingegangen werden, wie z.B. zwischen $\alpha 3$ und $\beta 5$ bzw. $\beta 5i$ oder zwischen $\alpha 6$ und $\beta 6$. Sollten die α -Untereinheiten mit den ebenfalls detektierten β -Untereinheiten initial komplexieren, würde dies das '*Rhodococcus*-Modell' der frühen Assemblierung von α - β -Dimeren auch in Eukaryoten befürworten (s. Kapitel 1.5.2). Da POMP ebenfalls in diesen Komplexen detektiert wurde, muß überprüft werden, ob der Maturierungsfaktor u.U. auch schon in die frühen Ereignisse der Proteasom-Formation involviert und nicht erst für die Maturierung essentiell ist.

4.1.2.2 KÖNNTEN PROTEINE DER 14-3-3-FAMILIE DIE LOKALISATION DER PROTEASOM-ASSEMBLIERUNG REGULIEREN?

Ein wichtiger Aspekt für die proteasomale Assemblierung liegt in der Kontrolle der subzellulären Lokalisation. Die zelluläre Verteilung von reifen 20S-Proteasomen wurde bisher in verschiedenen Zellen unterschiedlicher Gewebe untersucht (Wojcik and DeMartino, 2003). 20S-Proteasomen sind sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert, wobei der aktive Kernimport evtl. durch Kernlokalisationssequenzen (NLS, *nuclear localisation sequences*) einzelner α -Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ $\alpha 4$) vermittelt wird (Knuehl, et al., 1996; Tanaka, et al., 1992; Tanaka, et al., 1990).

Die Lokalisation der 20S-Biogenese ist hingegen bisher kaum erforscht. Yang *et al.* (1995) wiesen murine Precursorkomplexe nach subzellulärer Fraktionierung nahezu ausschließlich im Cytoplasma nach und schlossen daraus, dass die 20S-Assemblierung cytoplasmatisch lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu wurde durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen in humanen Zellen eine hauptsächlich ER-assoziierte Lokalisation von Precursorkomplexen beobachtet (B. Fricke, persönliche Mitteilung). Ob, wie in Hefe beschrieben (Lehmann 2002), auch *mammalia* Kern-Proteasomen initial im Cytoplasma assembliert und anschließend als Precursorkomplexe in den Kern importiert werden, ist fraglich. Es wird auch diskutiert, dass entweder Vorläuferkomplexe oder reife 20S-Proteasomen im Verlauf der Zellteilung durch die Restaurierung der Kernmembran innerhalb des Nucleus' eingeschlossen werden (Reits, et al., 1997).

Eventuell besteht ein komplexer Zusammenhang zwischen der Kinetik bzw. Lokalisation der Proteasom-Assemblierung und möglichen Modifikationen proteasomaler Untereinheiten. So könnte eine Phosphorylierung innerhalb von sauren Bereichen einzelner proteasomaler Untereinheiten bereits direkt mit der Funktion der NLS-Motive interferieren (Tanaka, et al., 1992; Tanaka, et al., 1990). Weiterhin wäre möglich, dass die Modifikation eine Bindung an 14-3-3-Proteine induziert, die den Oligomerkomplex ebenfalls cytoplasmatisch fixiert. 14-3-3-Proteine sind, wie oben beschrieben, als Modulatoren der subzellulären Lokalisation ihrer phosphorylierten Zielproteine charakterisiert worden. Somit könnte eine mögliche Phosphorylierung von proteasomalen Untereinheiten schon während der Initiation der Proteasom-Formation auf zwei Ebenen das 'Fixieren' der Assemblierungsintermediate im Cytoplasma unterstützen. Zusätzlich dazu wurde ebenfalls von Tanaka *et al.* der Einfluss von HSP90 in diesem Zusammenhang diskutiert. Auch dieses Chaperon könnte NLS-Motive maskieren und so additiv zur cytoplasmatischen Lokalisation der Assemblierungsintermediate beitragen (Tanaka, et al., 1992; Tanaka, et al., 1990).

Ob eine solche hypothetische 'Plattform' aus proteasomalen Untereinheiten, Kinasen, Chaperonen, wie z.B. HSP90, und allosterischen Cofaktoren, wie z.B. 14-3-3, existiert, erfordert intensivere Studien zur Initiation der Proteasom-Formation. Prinzipiell erscheint eine funktionelle Komplexierung möglich. Allerdings liegen in den isolierten EPIs 20S-

Komponenten und HSP90 bzw. 14-3-3-Proteine in nicht stöchiometrischen Verhältnissen vor. Dass alle drei Proteine bzw. Proteinkomplexe in einer sehr hohen Abundanz in der Zelle vorliegen, macht eine solche Interpretation zusätzlich schwierig. Das 20S-Proteasom macht bis zu 1% der löslichen Zellproteine aus (Tanaka and Ichihara, 1989). Die gleiche Häufigkeit wird für HSP90 selbst in nicht Hitze-induzierten Zellen beschrieben (Frydman, 2001). In Gehirnzellen nimmt 14-3-3 ebenfalls einen Anteil von 1% aller löslichen Proteine ein (Boston, et al., 1982). Trotzdem lassen einige der oben beschriebenen Hinweise die Diskussion zu, dass möglicherweise Komplexe mit funktioneller Relevanz für die Proteasom-Formation und deren Lokalisation isoliert wurden. Hierzu ist anzumerken, dass auch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe das Chaperon HSP90 in 20S-Proteasom-Aufreinigungen nachweisen konnten (N. Klare, pers. Mitteilung) sowie 14-3-3-Proteine in Precursorfraktionen bzw. HSP90-depletierten 20S-Proteasomisolaten anreicherten (B. Fricke bzw. N. Klare, persönliche Mitteilung). Sowohl die weitere biochemische Charakterisierung der isolierten EPIs, auch auf Ebene der identifizierten Subkomplexe, als auch die Untersuchung zur Relevanz möglicher Hilfsfaktoren für die Initiation der humanen 20S-Assemblierung bedarf weiterer Experimente. Daran anschließend sollten solche Untersuchungen auch auf IFN γ -stimulierte Zellen ausgeweitet werden. Möglicherweise könnte sich die Assemblierung von konstitutiven Proteasomen und Immunoproteasomen auch schon zum Zeitpunkt der Initiation und nicht erst in späteren Stadien der Maturierung unterscheiden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass IFN γ die Phosphorylierung der α 3- und α 7-Untereinheiten des humanen 20S-Proteasoms drastisch reduziert (Bose, et al., 2001). Diese Experimente weisen nicht nur auf veränderte Modifikationssmuster des reifen 20S-Proteasoms hin. Sie könnten auch als eine alternative Regulation der Immunoproteasom-Formation über andere Phosphorylierungsmuster interpretiert werden. Auch die Immunountereinheiten MECL-1 und LMP7 werden wahrscheinlich post-translational modifiziert, da sie in 2D-Gelen in unterschiedlich geladenen Isoformen zu detektieren sind (Salzmann, et al., 1999; Witt, et al., 2000). Immunoproteasomen liegen im Gegensatz zu den konstitutiven Komplexen hauptsächlich ER-assoziiert vor (Brooks, et al., 2000). Somit erscheint es möglich, dass unterschiedliche Modifikationen von Immunoproteasomen deren Assemblierung bzw. Lokalisation beeinflusst.

4.2 Die Maturierung humaner 20S-Proteasomen

4.2.1 Immunoproteasomen reifen schneller als konstitutive Proteasomen

Der kurzlebige Proteasom-Maturierungsfaktor POMP ist Bestandteil ausschließlich von proteasomalen Precursorkomplexen und spielt eine wichtige Rolle bei der Biogenese von eukaryotischen 20S-Proteasomen [s. Kapitel 1.5.6, (Burri, et al., 2000; Griffin, et al., 2000; Ramos, et al., 1998; Witt, et al., 2000)]. POMP bzw. seine Homologe wurden bisher

ausschließlich in Eukaryoten nachgewiesen, was auf ihre koordinierende Funktion bei der Assemblierung von Proteasomen größerer Komplexität (vgl. Kapitel 1.3) schliessen lässt. Dass bisher keine stabilen Transfektanten humaner Zelllinien etabliert werden konnten, die POMP überexprimieren [E. Krüger, persönliche Mitteilung, (Burri, et al., 2000)], weist auf eine elementare Bedeutung des Maturierungsfaktors in *mammalia* Zellen hin. Neben der geordneten Assemblierung der 14 verschiedenen proteasomalen Untereinheiten soll das 17kDa-Protein auch die korrekte Prozessierung der β -Proteine vermitteln. Sobald der 20S-Komplex vollständig zusammengelagert und gereift ist, wird inkorporiertes POMP als erstes Substrat degradiert. Die Degradation von POMP zeigt also die finale Maturierung und somit Aktivierung des neu formierten Proteasoms an (Ramos, et al., 1998).

Die möglicherweise besondere Bedeutung von POMP für die Maturierung von Immunoproteasomen wurde bisher aufgrund von verschiedenen Ergebnissen diskutiert (Burri, et al., 2000; Griffin, et al., 2000; Witt, et al., 2000). Die POMP-mRNA wird in murinen und humanen Zellen durch IFN γ -Stimulation induziert [vgl. Kapitel 3.2.1, (Burri, et al., 2000; Witt, et al., 2000)]. Bisher konnte jedoch keine erhöhte Expression von POMP in Immunoblots von Proteinlysaten IFN γ -behandelter Zellen dokumentiert werden. Vielmehr wurde nach Cytokin-Stimulation häufig eine Abnahme des Proteins unter *steady state*-Bedingungen beobachtet (Witt, et al., 2000). Burri *et al.* (2000) stellten ohne jeglichen experimentellen Nachweis die These auf, dass eine IFN γ -Stimulation auch auf Proteinebene POMP induzieren und dies in einer schnelleren *de novo* Assemblierung von Immunoproteasomen resultieren könnte. Im Gegensatz dazu konnte in anderen Studien kein Unterschied in der Maturierungskinetik von konstitutiven Proteasomen bzw. Immunoproteasomen beobachtet werden (Nandi, et al., 1997). POMP wurde bisher nur in isolierten Immuno-Precursorkomplexen mit verzögerter oder inhibierter Maturierung quantitativ detektiert (Griffin, et al., 2000; Witt, et al., 2000). So beschrieben Witt *et al.* (2000) eine Korrelation der Mengen von POMP und der Akkumulation von maturierungs-beeinträchtigten Precursorkomplexen. Diese Beobachtung führte zu der These, dass POMP in den Precursorkomplexen stabilisiert werden könnte und dass die Halbwertszeit von POMP womöglich mit der von Precursorkomplexen korreliert.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass in humanen IFN γ -stimulierten Zellen die vermehrte Expression der POMP-mRNA auch eine gesteigerte Proteinexpression von POMP zur Folge hat (vgl. Kapitel 3.2.1 und 3.2.2). Weiterhin wurde gezeigt, dass das Maturierungsprotein POMP *in vivo* eine Komponente sowohl von konstitutiven als auch von Immuno-Precursorkomplexen ist (vgl. Kapitel 3.2.2), wie spezifische Immunpräzipitationen aus metabolisch ³⁵S-markierten Zellen zeigten. Ein Vergleich der Kinetik der Maturierung von Immuno-Precursorkomplexen in IFN γ -stimulierten Zellen mit der von konstitutiven Precursorkomplexen in unbehandelten Kontrollzellen zeigte ebenfalls Unterschiede auf (vgl. Kapitel 3.2.2). Als Kriterien zur Einschätzung der Maturierungskinetik dienten dabei die Stabilität von POMP, die Abnahme der gesamten Precursorkomplexe und

die Prozessierung der humanen Homologen $\beta 5$ / MB1 bzw. $\beta 5i$ / LMP7. Sowohl die Halbwertszeit der Precursorkomplexe bzw. von POMP als auch die Prozessierungskinetik korrelierten dabei. Somit konnte POMP als Marker für die fortschreitende Maturierung des humanen 20S-Proteasoms etabliert werden, wobei dies sowohl für konstitutive, als auch für Immunoproteasomen zutrifft. Die verschiedenen Immunpräzipitationen zeigten eindeutig, dass sich die Kinetik der Maturierung von konstitutiven und Immunoproteasomen signifikant unterscheidet. Immuno-Precursorkomplexe maturieren durchschnittlich vierfach schneller als konstitutive Precursorkomplexe. In Folge dessen unterliegt POMP in $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten Zellen einer vierfachen schnelleren Degradation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dadurch kann der fehlende Nachweis vermehrter POMP-Mengen trotz erhöhter POMP-Synthese in $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten Zellen durch eine verminderte Stabilität erklärt werden. Die durchschnittliche Halbwertszeit von POMP, inkorporiert in konstitutive Precursorkomplexe unbehandelter Zellen, beträgt 82min. Durch die beschleunigte Maturierung der Immuno-Precursorkomplexe verringert sich die Halbwertszeit von POMP auf 21min in $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten Zellen.

Dieser erstmalig dokumentierte Unterschied zwischen der Maturierungskinetik von konstitutiven und der von Immunoproteasomen entspricht den oben aufgeführten Thesen zur Bedeutung von POMP für die Immunoproteasom-Assemblierung (Burri, et al., 2000; Witt, et al., 2000). Dieses neue Resultat steht jedoch im Kontrast zu Publikationen, die vor der Beschreibung von POMP entstanden und keinen Unterschied in der Reifung der verschiedenen Precursorkomplexe dokumentierten (Frentzel, et al., 1994; Griffin, et al., 1998; Nandi, et al., 1997). In diesen frühen Experimenten wurde zwar ein 17kDa Protein in 2D-Gelen von murinen Precursorkomplexen detektiert, dieses war jedoch damals noch nicht als der Maturierungsfaktor POMP charakterisiert worden. Deshalb konnte POMP als Marker der Proteasom-Maturierung nicht berücksichtigt werden, wodurch eine Interpretation der unterschiedlichen Halbwertszeit beider Precursorkomplexe ausblieb.

Bisherige Publikationen beschrieben häufig sehr lange Halbwertszeiten von mehreren Stunden für proteasomale Precursorkomplexe [s. Kapitel 1.5.3, (Frentzel, et al., 1994; Nandi, et al., 1997; Rodriguez-Vilarino, et al., 2000)]. Im Gegensatz dazu unterstützen Experimente, die geringere Stabilitäten der Precursorkomplexe belegen, die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse. So maturierte z.B. $\beta 5i$ / LMP7 in humanen B-Zellen mit einer Halbwertszeit der Proform von 2h (Glynne, et al., 1993). Nach der gleichen Zeit war die Reifung von Precursorkomplexen in murinen Zellen bereits abgeschlossen (Yang, et al., 1995). Noch schneller maturierte die $\beta 7$ -Untereinheit in humanen, embryonalen Zellen mit einer Halbwertszeit der Proform von ca. 10min (Thomson and Rivett, 1996). Somit scheint sowohl der Anteil von Precursorkomplexen als auch deren Stabilität maßgeblich vom Zelltyp und dessen Proliferationsrate determiniert zu werden [vgl. Kapitel 1.5.3, (Nandi, et al., 1997; Rodriguez-Vilarino, et al., 2000)].

Wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, ist die beschleunigte Maturierung eine intrinsische Eigenschaft von Immuno-Precursorkomplexen und hängt nicht von möglichen weiteren, $\text{IFN}\gamma$ -induzierten Faktoren ab. Die für diese Experimente verwendete Zelllinie T2 ist aufgrund einer MHC II-Locus Deletion u.a. LMP2- und LMP7-defizient. Die dritte Immununtereinheit MECL-1, die nicht innerhalb dieses Locus codiert wird, wird in T2-Zellen konstitutiv exprimiert. Da die Immununtereinheiten MECL-1 und LMP2 kooperativ in Immunoprecursor-Komplexe eingebaut werden (Groettrup, et al., 1997), wird MECL-1 nicht inkorporiert (vgl. Kapitel 1.5.5). Erst durch die Transfektion mit Expressionsplasmiden für LMP2 und LMP7 werden in T2-Zellen Immunoproteasomen generiert. Wie in Kapitel 3.2.6 gezeigt, erfordert die Destabilisierung von POMP in T2-Zellen die Anwesenheit von LMP7. In T2 LMP2-Zellen wird POMP nicht destabilisiert. Auch die durch LMP7 vermittelte proteolytische Aktivität ist für eine beschleunigte POMP-Degradation essentiell, wie Experimente mit T2-Derivaten zeigten (um Propeptid verkürzte LMP7-Variante $\Delta\text{proLMP7}$ bzw. proteolytisch inaktives LMP7_T1A). Somit kann ausschließlich aktivierbares $\beta 5$ / LMP7, im Gegensatz zu seinem konstitutiven Homolog MB1, einen beschleunigten POMP-Umsatz auslösen. Griffin *et al.* (1998) beobachteten ebenfalls in T2-Zellen, dass für eine effiziente Maturierung von LMP2 in Immuno-Precursorkomplexen zwar LMP7 inkorporiert werden musste, dass dessen Aktivität dafür aber nicht erforderlich war. LMP2 reifte auch dann vollständig, wenn die inaktive LMP7_T1A-Variante, die selbst nur bis zu Intermediärform prozessiert wird, transfiziert wurde. Folglich muß LMP7 verschiedene Anforderungen im Prozess der Maturierung von Immunoproteasomen erfüllen. Für eine Maturierung der anderen Immununtereinheiten muss die LMP7-Untereinheit allein strukturelle Komponente von Immuno-Precursorkomplexen sein (Griffin, et al., 1998). Die Experimente der vorliegenden Arbeit wiesen jedoch nach, dass die proteolytische Aktivität von LMP7 für die finale Maturierung und die POMP-Degradation essentiell ist. Die Dynamik der Immunoproteasom-Maturierung wird somit letztlich durch ein funktionelles Zusammenspiel von aktivem LMP7 und POMP reguliert.

4.2.2 Wie wird die schnellere Immunoproteasom-Formation reguliert?

Eine beschleunigte Immunoproteasom-Assemblierung erfordert neben den, durch $\text{IFN}\gamma$ induzierten Immununtereinheiten auch die Bereitstellung größerer Proteinmengen der restlichen proteasomalen Untereinheiten. Die Regulation der α - und der inaktiven β -Untereinheiten kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Entweder wird die Menge an translatierbarer mRNA durch gesteigerte Transkription oder durch verstärkte Transkript-Stabilität erhöht. So wird die verstärkte POMP-mRNA-Expression in $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten Zellen auch post-transkriptionell über eine erhöhte Transkript-Stabilität realisiert (D. Heyken, persönliche Mitteilung). Auch eine erhöhte Translationseffizienz ist denkbar, um mehr Protein zu synthetisieren. Es wurde vielfach diskutiert, dass proteasomale Untereinheiten, die nicht in

Assemblierungsintermediate inkorporiert werden, bereits als Monomer wieder degradiert werden (Coux, et al., 1996; Olson and Dice, 1989). Eventuell ersetzt diese Degradation eine möglicherweise fehlende Feinregulation der Proteasom-Expression auf Transkriptionsebene (Coux, et al., 1996). Diesem Ansatz folgend, könnten in humanen Zellen auch ohne IFN γ -Stimulation beständig proteasomale Untereinheiten im Überschuß synthetisiert werden. Unter dem Einfluß des Cytokins könnte diese 'basale' Expression dennoch für eine gesteigerte Immunoproteasom-Formation ausreichen, wenn entsprechend weniger oder gar keine proteasomalen Untereinheiten als Monomer degradiert würden. Auch das Zurückgreifen auf einen Pool prä-assemblierter kleiner Komplexe (EPIs), die in den Zellen vorliegen (vgl. Kapitel 3.1.3 und 3.1.4), würde den erhöhten Bedarf an proteasomalen Untereinheiten zumindest kurzzeitig decken. Nicht auszuschließen ist, dass auch einzelne Untereinheiten genutzt werden, die aus abgebauten Proteasomen stammen. Dies betrifft allerdings nur Untereinheiten die während der Maturierung von Proteasomen nicht prozessiert werden müssen, also α - und die β -Untereinheiten ohne Prosequenz.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zu diesem Thema nur initiale Experimente durchgeführt werden (vgl. Kapitel 3.2.8). Mittels semiquantitativen RT-PCR-Analysen konnte keine gesteigerte mRNA-Expression der proteasomalen α - und inaktiven β -Untereinheiten in IFN γ -stimulierten HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Geht man davon aus, dass der Bedarf an proteasomalen Komponenten für die beschleunigte Immunoproteasom-Formation ausschließlich durch eine erhöhte mRNA-Expression gedeckt wird, ist mit einer dreifachen mRNA-Menge der 20S-Untereinheiten zu rechnen. Zum Nachweis solch moderater Abweichungen ist die RT-PCR-Methode womöglich nicht ausreichend sensitiv. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass mit sensitiveren Methoden wie z.B. TaqMan-PCR derartige Unterschiede zwischen unbehandelten und IFN γ -stimulierten Zellen aufgezeigt werden könnten. So konnte eine konzertierte, ca. 2-3fach gesteigerte Expression proteasomaler Transkripte in Proteasominhibitor-behandelten Primärzellen mittels einer solchen Taqman-Analyse gezeigt werden (Meiners, et al., 2003). Als weiterer Ansatz, feinere Unterschiede in der mRNA-Expression proteasomaler Untereinheiten in humanen Zellen in Abhängigkeit von deren Cytokin-Stimulation aufzuzeigen, sind cDNA-Microarray-Analysen in Planung. Dass möglicherweise prä-assemblierte kleine Komplexe als Pool für die beschleunigte Immunoproteasom-Formation dienen, wurde anhand von kurzzeitig IFN γ -stimulierten HeLa-Zellen untersucht (vgl. Kapitel 3.2.8). Die transiente, moderate Abnahme von EPIs könnte eine kurzfristige Sicherung des Bedarfs an proteasomalen Untereinheiten gewährleisten. Die endgültige Klärung der Frage, über welche u.U. additiv wirkenden Regulationsmechanismen letztlich mehr proteasomale Untereinheiten für die schnellere Immunoproteasom-Formation bereit gestellt werden, erfordert weitere Experimente und bleibt weiterhin Gegenstand der Forschung der Arbeitsgruppe.

4.2.3 *in vivo* werden bevorzugt homogene Immunoproteasomen generiert – LMP7-Transkriptvarianten und -Allele

Bei der Untersuchung verschiedener humaner Zelllinien hinsichtlich der POMP-Stabilität und der Maturierungskinetik ihrer Precursorkomplexe wurden einige Sonderfälle beobachtet (vgl. Kapitel 3.2.3). So konnte in der humanen Coloncarcinom-Zelllinie Rko nach IFN γ -Stimulation eine verzögerte Immunoprecursor-Maturierung und damit verbunden eine starke POMP-Stabilisierung beobachtet werden. Rko-Zellen exprimieren nach Cytokin-Stimulation die Immunountereinheiten LMP2 und MECL-1, im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollzellen. Obwohl eine Northern Blot-Analyse eine Induktion der LMP7-mRNA durch IFN γ anzeigte, wurde jedoch weder in den stimulierten, noch in den unbehandelten Rko-Zellen eine signifikante Proteinexpression der Immunountereinheit LMP7 nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz zwischen mRNA- und Protein-Expression wurde mittels RT-PCR-Experimenten, spezifisch für die beiden humanen LMP7-Transkriptvarianten E1 [E1a] und E2 [E1b], aufgelöst. Vom humanen *PSMB8*-Gen werden zwei verschiedene mRNAs infolge von alternativem Exon *usage* transkribiert (vgl. Kapitel 1.6). Die aus beiden mRNAs resultierenden Proteine unterscheiden sich nur in den Prosequenzen, die maturierten Proteine wären identisch. Die LMP7_E1-mRNA wird in verschiedenen humanen Zellen konstitutiv exprimiert und nach einem IFN γ -Stimulus herab reguliert (vgl. Kapitel 3.2.4). Ob die LMP7_E1-mRNA überhaupt translatiert wird, ist fraglich. LMP7_E1-Protein wird jedenfalls *in vivo* nicht quantitativ in naszierende Immuno-Precursorkomplexe inkorporiert, da dessen Prosequenz sich stark von der von LMP7_E2 unterscheidet. Die eigentliche, Immunoproteasom-relevante Form LMP7_E2 wird sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene durch IFN γ signifikant induziert (Fruh, et al., 1992; Glynn, et al., 1993; Griffin, et al., 1998; Kingsbury, et al., 2000; Meinhardt, et al., 1993; Yang, et al., 1995). Warum ausschließlich vom humanen *PSMB8*-Gen zwei alternative Transkripte exprimiert werden und worin die Funktion von LMP7_E1 liegt, ist unbekannt. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass auch von humanem LMP2 zwei unterschiedliche mRNA-Formen existieren, die hier aber infolge von alternativem Spleißen generiert werden. Die resultierenden Proteine unterscheiden sich durch eine kurze Deletion von zehn Aminosäuren innerhalb des ersten Exon, das ebenfalls für die Prosequenz codiert (Singal, et al., 1995). Auch dieses Auftreten zweier LMP2-Varianten kann bisher noch keiner Funktion zugeordnet werden.

Auch nach einem IFN γ -Stimulus, der für gewöhnlich die Immunoproteasom-relevante LMP7_E2-mRNA induziert, exprimieren Rko-Zellen nahezu ausschließlich die LMP7_E1-mRNA (vgl. Kapitel 3.2.4). Falls die LMP7_E1-mRNA doch quantitativ translatiert wird, wird diese Proteinvariante aufgrund fehlender Inkorporation rasch degradiert, da LMP7_E1-Protein zumindest *in vivo* nicht detektiert werden kann [eigene Daten und (Griffin, et al., 1998; Yang, et al., 1995)]. Dies erklärt die Defizienz für LMP7-Protein auch in IFN γ -stimulierten Rko-Zellen und unterstreicht erneut die Bedeutung der korrekten Prosequenz für die Inkorporation von

LMP7 in naszierende Immunoproteasomen (Kingsbury 2000). Diese Defizienz an (inkorporierbarem) LMP7 in IFN γ -stimulierten Rko-Zellen führt zu einer Akkumulation von Precursorkomplexen, in denen u.a. pro-LMP2, pro-MECL-1 und POMP vorliegen, was mit bisher publizierten Daten korreliert. In naszierende Immuno-Precursorkomplexe werden die Untereinheiten LMP2 (β 1i) und MECL-1 (β 2i) kooperativ früh inkorporiert (Groettrup, et al., 1997; Nandi, et al., 1997). Im Gegensatz dazu wird in konstitutive Precursorkomplexe die homologe Untereinheit β 1 (δ) spät eingebaut [vgl. Kapitel 1.5.5, (Nandi, et al., 1997)]. Zahlreiche Untersuchungen haben die Existenz verschiedener intermediärer 'Mischformen' von Proteasomen beschrieben, die sowohl Immuno- als auch konstitutive β -Untereinheiten enthalten (Dahmann, et al., 2000; De, et al., 2003). Allerdings können diese Mischformen nicht in allen möglichen Kombinationen beobachtet werden (De, et al., 2003). So legt die frühe Inkorporation von LMP2 (β 1i) und MECL-1 (β 2i) den naszierenden Komplex auf später homogene Immunoproteasomen fest, da ausschließlich LMP7 (β 5i) in diese Precursorkomplexe dirigiert wird und dadurch eine Maturierung auslöst (De, et al., 2003; Kingsbury, et al., 2000). Endogen vorhandenens β 5 / MB1 kann nicht in ausreichendem Maße in diese Immuno-Precursorkomplexe inkorporiert werden, weshalb diese nicht quantitativ maturieren. Der in IFN γ -stimulierten Rko-Zellen beobachtete Phänotyp stützt somit das Modell, dass sobald LMP2 und MECL-1 in naszierende Proteasomen eingebaut werden, diese nur durch die zusätzliche Inkorporation von LMP7 zu homogenen Immunoproteasomen maturieren. Auffällig dabei ist, dass in IFN γ -stimulierten Rko-Zellen das Maturierungsprotein POMP, außer in den bereits beschriebenen Precursorfraktionen, auch in leichten Gradientenfraktionen, in denen EPIs sedimentieren, angereichert wird. Dies weist erneut darauf hin, dass POMP womöglich nicht erst in den späten Phasen der Assemblierung in die Precursorkomplexe dirigiert werden könnte (vgl. Kapitel 4.1.2). In Gradienten von Zellen, die durch eine schnelle Immunoproteasom-Formation charakterisiert sind (wie z.B. HeLa-Zellen), kann POMP dort nicht detektiert werden. Die durch IFN γ -induzierte Menge von POMP in Rko-Zellen wird also nicht nur aufgrund der verzögerten Maturierung unzureichend degradiert, es reichert sich auch in sehr kleinen Komplexen der frühen Proteasom-Formation an.

Die Ursache für die dysregulierte LMP7-Expression in Rko-Zellen ist z.Z. noch ungeklärt. Geht man davon aus, dass die beiden alternativen Transkripte LMP7_E1 bzw. E2 durch die Nutzung unterschiedlicher Transkriptionsstarts generiert werden, liegt der putative Promotor für LMP7_E2 im Intron zwischen Exon 1 und Exon 2. Dort wurden u.a. multiple γ -IRE-Motive (*Interferon γ response elements*) beschrieben (vgl. Kapitel 1.6). Die genomische Sequenzierung des *PSMB8* Locus in Rko Zellen zeigte keine Mutationen in den potentiellen Promotorregionen. Allerdings konnte eine Nucleotid-Deletion (innerhalb des C-Sextetts N₃₆ bis N₄₁ von NM_148919) im Exon 2 des *PSMB8* Locus von Rko-Zellen beschrieben werden. Die daraus resultierende Verschiebung im Leserahmen könnte zwar eine Translation der mutierten LMP7_E2-mRNA erlauben, aber die Inkorporation des resultierenden Proteins könnte vollständig inhibiert sein, so dass dieses mutierte Protein rasch degradiert wird. Warum

allerdings die LMP7_E1-mRNA durch IFN γ -Stimulation von Rko-Zellen induziert wird, kann damit nicht erklärt werden. Möglicherweise ist dies aber ein Phänomen, das eine maligne Transformation von humanen Zellen begünstigt. Wie in den Kapiteln 3.2.4 und 3.2.7 beschrieben, zeigen auch die Colonicarcinom-Zellen DLD-1 und Caco-2 diese ungewöhnliche Regulation der LMP7-mRNA-Varianten auf. Caco-2-Zellen reagieren zwar auf einen IFN γ -Stimulus mit einer moderaten Induktion von LMP7_E2-mRNA, stärker wird jedoch die LMP7_E1-mRNA induziert. Dies geht auf Proteinebene mit einer unzureichenden LMP7-Expression, einer ineffizienten LMP2-Maturierung und einer retardierten POMP-Degradation in IFN γ -stimulierten Caco-2-Zellen einher. Caco-2-Zellen zeigen somit prinzipiell den gleichen, allerdings graduell abgestuften Phänotyp wie Rko-Zellen auf. Die ausschließliche Expression des Allels LMP7_E2_K scheint jedoch nicht die Ursache für die unzureichende LMP7_E2-Proteinexpression in Caco-2-Zellen zu sein (vgl. Kapitel 3.2.7). Die Transfektion von LMP7_E2-defizienten Rko-Zellen mit Plasmiden codierend für beide Varianten LMP7_E2_K bzw. LMP7_E2_Q zeigte keine Unterschiede in der Inkorporations- und Maturierungseffizienz beider LMP7-Varianten auf. Somit werden beide Varianten in gleichem Ausmaß in naszierende Immunoproteasomen von IFN γ -stimulierten Rko-Zellen eingebaut. Der diesen Q/K-Aminosäureaustausch hervorrufoende *single nucleotid polymorphism* (SNP) liegt direkt neben der 3' *splice site* von Exon 2. Demzufolge kann nicht ausgeschlossen werden, dass zwar der SNP nicht auf Proteinebene zum Tragen kommt, aber die Effizienz des Spleißens dieser SNP-tragenden mRNA beeinträchtigt sein könnte. Ein solcher Effekt des SNP könnte auch eine verminderte Expression von LMP7_E2_K-mRNA und damit des Proteins in den für LMP7_E2_K homozygoten Caco-2-Zellen nach sich ziehen. Die Analyse von LMP7-Transkripten in Caco-2-Zellen mittels RT-PCR-Amplifikation konnte allerdings keine ungewöhnlichen Transkripte aufzeigen. Nach einer LMP7-Exon 3-spezifischen reversen Transkription und anschließender PCR mit LMP7_E1- bzw. LMP7_E2-spezifischen Primern konnten keine größeren Amplifikate nachgewiesen werden, die ein gestörtes Spleißen des Introns 2 aus der prä-mRNA indizieren würden.

Die Auswirkung des nicht-funktionellen LMP7_E1-Transkripts auf die Expression von LMP7_E2_{K/Q} wurde ebenfalls untersucht. Hierfür wurden ebenfalls Rko-Zellen benutzt, die nach IFN γ -Stimulation keine LMP7_E2-, aber LMP7_E1-mRNA exprimieren. Eine zusätzlich zur endogenen LMP7_E1-Expression gesteigerte Expression von LMP7_E1 zeigte keinen dosisabhängigen Effekt auf die Expression, Inkorporation und Maturierung der cotransfizierten LMP7_E2-Varianten. Somit konnte gezeigt werden, dass auf Transkript-Ebene LMP7_E1 keine inhibitorische Wirkung auf LMP7_E2 ausübt. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass bei der Transkription der beiden alternativen mRNAs vom selben *PSMB8* Locus eine gegenseitige Beeinflussung stattfindet. Eine gesteigerte Transkription von LMP7_E1, deren Ursache ungeklärt ist, könnte die Effizienz der Transkription von LMP7_E2 beeinträchtigen.

Der Nachweis, dass die LMP7_E1-Variante das vorherrschende *PSMB8*-Genprodukt von Rko- und Caco-2-Zellen ist und auch in allen anderen untersuchten Zellen (wenn auch auf

einem geringeren Niveau) exprimiert wird, ist ein überraschendes und interessantes Ergebnis. Möglicherweise besitzt LMP7_E1 eine regulatorische Funktion bei der 'Feineinstellung' der Immunoproteasom-Biogenese und übt einen inhibitorischen Einfluss auf die Expression von LMP7_E2 aus. Dass LMP7_E1 nach IFN γ -Stimulation im Normalfall weniger exprimiert wird, könnte eine dann induzierte Immunoproteasom-Formation erlauben, während ohne den IFN γ -Stimulus die Immunoproteasom-Formation reprimiert wird. Somit könnte eine 'kritische Balance' zwischen den LMP7_E1- und LMP7_E2-Transkripten über einen bisher unbekannten Mechanismus die Effizienz der Immunoproteasom-Formation determinieren.

4.3 Die Defizienz an proteasomalen Immun-untereinheiten und Pathogenese

Zahlreiche Tumoren wurden als Immunoproteasom- und insbesondere LMP7-defizient beschrieben (Atkins, et al., 2004; Cabrera, et al., 2003; Cabrera, et al., 2004; Ehrlich, 1997; Garcia-Lora, et al., 2003; Kang, et al., 2000; Khong and Restifo, 2002; Seliger, et al., 2003; Seliger, et al., 2000; Sun, et al., 2002). Diese Beobachtung wird in Zusammenhang mit Immunevasions-Strategien und dem oncogenen Potential der Zellen gebracht. Immunoproteasomen weisen zwar keine grundlegend veränderte proteolytische Aktivitäten im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen auf, generieren aber zumindest effizienter verschiedene antigene Peptide und damit ein divergentes Repertoire an Peptidliganden von MHC I-Molekülen (Fehling, et al., 1994; Kuckelkorn, et al., 1995; Sibille, et al., 1995; Van Kaer, et al., 1994). Vor allem für zahlreiche virale MHC I-Epitope konnte eine optimierte Generierung durch Immunoproteasomen beschrieben werden (Schwarz, et al., 2000; Sijts, et al., 2000; Sijts, et al., 2000; Van den Eynde and Morel, 2001; van Hall, et al., 2000). Der Einfluss von Immunoproteasomen auf die Prozessierung von Tumorantigenen ist bisher noch nicht ausreichend untersucht. Einerseits wurden tumorspezifische Antigene beschrieben, die durch Immunoproteasomen besser generiert werden (Schultz, et al., 2002), andererseits wurde auch eine effizientere Generierung von bestimmten Tumorepitopen durch konstitutive Proteasomen gezeigt (Morel, et al., 2000). In diesem Zusammenhang ist auch der Einfluss des Proteasom-Aktivators PA28 von Bedeutung, der ebenfalls durch IFN γ induziert wird und unabhängig von der Existenz proteasomaler Immununtereinheiten die Generierung verschiedener Tumorepitope beeinflusst (Sun, et al., 2002). Der Immununtereinheiten-Mangel verschiedener Tumorzelllinien ist graduell abgestuft und hat unterschiedliche Ursachen, wie z.B. Mutationen oder die Inhibierung der Expression durch virale Proteine (Proffitt and Blair, 1997). Einige Tumorzellen sind durch eine verminderte Expression der Immununtereinheiten im Vergleich zu nicht entarteten Zellen des gleichen Gewebes charakterisiert [Review: (Van den Eynde and Morel, 2001)]. Manche Tumorzellen zeichnen sich durch eine fehlende Expression von Immunoproteasomen aus, die aber durch eine IFN γ -Stimulation restauriert werden kann (Miyagi, et al., 2003; Restifo, et al., 1993), während

andere maligne entartete Zellen als eindeutig defizient bezüglich des IFN γ -Signaltransduktionsweges charakterisiert wurden (Dovhey, et al., 2000). Diese verschiedenen Mechanismen bewirken eine verminderte oder ausbleibende Expression von Immunoproteasomen bzw. anderen Komponenten der MHC I-Kaskade in diesen Tumorzellen. Dadurch wird eine effiziente Prozessierung und Präsentation von tumorspezifischen MHC I-Epitopen durch maligne entartete Zellen verhindert, die dadurch schlechter durch CD8⁺ CTLs erkannt werden. Sie umgehen somit eine effektive adaptive Immunantwort, was eine weitere Expansion des Tumors erleichtert.

Die untersuchten Colocarzinom-Zellen Rko und Caco-2 könnten durch die beeinträchtigte Synthese reifer Immunoproteasomen aufgrund der verminderten bzw. fehlenden Expression von LMP7 ebenfalls einer effektiven Immunantwort entgangen sein. Warum diese Zelllinien auch nach einer IFN γ -Stimulation kein bzw. nur eingeschränkt LMP7 exprimieren, ist unklar. Da andere cytokin-stimulierbare Proteasom-Komponenten nach einer IFN γ -Exposition der Zellen induziert wurden (vgl. Kapitel 3.2.3 und 3.2.7), ist ein genereller Defekt des IFN γ -Signaltransduktionsweges ausgeschlossen. Die Regulation des *PSMB8* (LMP7)-Gens ist bisher, im Gegensatz zu *PSMB9* (LMP2) und *PSMB10* (MECL-1), nur unzureichend charakterisiert (vgl. Kapitel 1.6). Sowohl die Regulation der Expression von *PSMB8*, als auch die Funktion der Transkriptvariante LMP7_E1 bedarf weiterer Untersuchungen. Daraus könnte sich ein möglicher Einfluß der Expression von LMP7_E1 in maligne entarteten Zellen auf die Tumorentstehung ableiten. Die stabilen LMP7-Transfektanten von Rko (vgl. Kapitel 3.2.5) zeigten nach IFN γ -Stimulation keine erhöhte Oberflächenexpression von Peptid-MHC I-Komplexen, wie eine FACS-Analyse von Gesamt-MHCI-Molekülen darlegte. Dieser ausbleibende quantitative Effekt schließt jedoch keinen qualitativen Einfluß von Immunoproteasomen aus, denn wahrscheinlich wird auf den transfizierten Rko-Zellen ein anderes Peptid-Repertoire präsentiert. Ob mögliche Tumorantigene von humanen Colocarzinom-Zellen durch Immunoproteasomen effizienter generiert werden, ist unbekannt. Somit muss ein möglicher funktioneller Zusammenhang zwischen der fehlenden Immunoproteasom-Expression und der evtl. dadurch hervorgerufenen Beeinträchtigung in der Präsentation von Tumorepitopen durch diese Rko-Zellen offen gelassen werden.

Einige Publikationen haben eine signifikante Korrelation verschiedener humaner Erkrankungen mit der Expression der allelen Varianten von LMP7_E2_{K/Q} beschrieben (s. Kapitel 1.6). Auch in verschiedenen humanen Colocarzinom-Zellen konnte ein signifikant erhöhtes Auftreten des LMP7_E2_K-Allels beschrieben werden (B. Fellerhoff, persönliche Mitteilung). Dies führte zu der Annahme, dass die Expression dieses Allels eine maligne Entartung befördern könnte. In den hier durchgeführten Experimenten konnte kein Einfluß der LMP7-Variation auf die Translation und die Inkorporationseffizienz in Immunoprecursorkomplexe festgestellt werden. Ob das LMP7_E2_K-Allel direkt die Expression von Immunoproteasomen beeinflusst oder ein übergeordneter Effekt auf die Präsentation von möglichen Colocarzinom-spezifischen Tumorantigenen vorliegt, ist z.Z. unklar.

4.4 Die Stabilität verschiedener 20S-Proteasomen und die proteasomale Homöostase

Wie in Kapitel 1.7 beschrieben, wurden bisher recht unterschiedliche Werte für die Stabilität von *mammalia* Proteasomen publiziert. Die in dieser Arbeit vorgelegten Experimente unterschieden zum ersten Mal die Stabilität von konstitutiven und Immunoproteasomen (vgl. Kapitel 3.3). Dabei konnte ein signifikanter Unterschied in der Halbwertszeit beider Proteasomen-Typen festgestellt werden. In T2-Zellen besitzen konstitutive Proteasomen eine Halbwertszeit von 5,5 Tagen, die vergleichbar zu der bereits publizierten Halbwertszeit konstitutiver Proteasomen in HeLa-Zellen ist (Hendil, 1988). Im Gegensatz dazu wurde in den Immunoproteasom-exprimierenden T2 2/7-Zellen eine Halbwertszeit von ca. 1 Tag bestimmt. Somit sind Immunoproteasomen in diesen Zellen fünffach labiler als konstitutive Proteasomen. Die Stabilität beider Proteasom-Typen wird nicht durch weitere IFN γ -induzierbare Faktoren beeinflusst. Somit ist die Halbwertszeit eine intrinsische Eigenschaft beider Komplexe, die womögliche durch strukturelle Unterschiede determiniert wird. Da konstitutive Proteasomen und Immunoproteasomen chromatographisch voneinander zu trennen sind, existieren solche strukturellen Unterschiede (Dahmann, et al., 2000). Auch in HeLa-Zellen wurde die unterschiedliche Stabilität beider Komplexe untersucht. Obwohl auch dort die Tendenz einer verminderten Halbwertszeit festzustellen war, sind die diesbezüglichen Ergebnisse kritisch zu betrachten. Zur Untersuchung der Stabilität von Immunoproteasomen, wurden HeLa-Zellen zunächst mit IFN γ stimuliert und anschließend metabolisch radioaktiv markiert. Daraus resultierte eine lange Kulturdauer von mindestens 6 Tagen. IFN γ wirkt auf HeLa-Zellen proliferationshemmend (vgl. Kapitel 3.3.1). Ein Vergleich der Stabilität von konstitutiven Proteasomen aus unbehandelten mit der von Immunoproteasomen aus stimulierten HeLa-Zellen ist daher aufgrund der sehr unterschiedlichen Proliferationsraten kaum möglich.

Keine der bisherigen Publikationen untersuchte, ob sich eine Induktion der Immunoproteasom-Formation durch IFN γ auf die Stabilität der prä-existenten konstitutiven Proteasomen auswirkt. Aki *et al.* (1994) beschrieben, dass die IFN γ -Stimulation weder das 2D-Musters von prä-existenten reifen 20S-Proteasomen noch den Gesamtgehalt an Proteasomen verändert. Um zu überprüfen, ob das Cytokin die Halbwertszeit der schon existierenden konstitutiven Proteasomen beeinflusst, wurden HeLa-Zellen zunächst metabolisch radioaktiv markiert und anschließend mit IFN γ stimuliert. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Stabilität konstitutiver Proteasomen in Abhängigkeit von der IFN γ -Stimulation, also von der Immunoproteasom-Formation, beobachtet werden. In HeLa-Zellen wurde allerdings mit ca. 2 Tagen eine wesentlich kürzere Halbwertszeit von konstitutiven Proteasomen ermittelt als in T2-Zellen. Die verschiedenen Halbwertszeiten von Proteasomen in unterschiedlichen Zellen wurde als Ergebnis unterschiedlicher Proliferationsraten und Differenzierungsstadien gewertet (Nandi, et al., 1997). Zellen in 'ruhenden' Geweben sind sowohl durch eine hohe Proteasom-Stabilität als auch durch eine sehr geringe Syntheserate von Proteasomen, verbunden mit

einer schwachen Expression von proteasomalen Precursorkomplexen, charakterisiert. Im Gegensatz dazu zeichnen sich schnell proliferierende Zellen, wie z.B. maligne entartete Tumorzellen, durch einen höheren Umsatz von Proteasomen aus (Tanaka, 1994; Tanaka and Ichihara, 1989), es wurden jedoch auch wesentlich mehr Precursorkomplexe detektiert (Nandi, et al., 1997).

Die unterschiedlichen Halbwertszeiten von Proteasomen in HeLa- und T2-Zellen müssen allerdings auch unter anderen Gesichtspunkten diskutiert werden. Immunzellen und Zellen lymphoider Organe wie Milz, Lymphknoten und Thymus exprimieren 'konstitutiv' (im Sinne von permanent) Immunoproteasomen [vgl. Kapitel 1.4, (Macagno, et al., 1999; Stohwasser, et al., 1997)]. Nicht-lymphoide Zellen hingegen exprimieren in nicht-stimuliertem Zustand vorwiegend konstitutive Proteasomen. Die Regulation der 'permanenten' Immunoproteasom-Expression in Immunzellen unterscheidet sich von der IFN γ -induzierten Expression (Barton, et al., 2002). Diese unterschiedlichen Expressionsniveaus resultieren somit in verschiedenen proteasomalen 'Haushalten' der Zellen. T2-Zellen sind lymphoblastoide Abkömmlinge und damit prinzipiell als 'permanent' Immunoproteasom-exprimierende Immunzellen einzuordnen. Möglicherweise beruht darauf auch das Ausbleiben eines antiproliferativen Effekts von IFN γ auf T2-Zellen, obwohl sie einen nachweislich funktionellen IFN γ -Signaltransduktionsweg besitzen (vgl. Kapitel 3.3.1). HeLa-Zellen exprimieren im Gegensatz dazu nur nach einer Cytokin-Stimulation relevante Mengen an Immunoproteasomen. Da die prä-existenden konstitutiven Proteasomen aber durch eine IFN γ -Stimulation nicht schneller abgebaut werden, ergibt sich in der Zelle ein Überschuß an Proteasomen. Durch eine ELISA-gestützte Quantifizierung (Egerer, et al., 2002) von Proteasomen aus HeLa-Zellen, die nicht zwischen konstitutiven und Immunoproteasomen unterscheidet, konnte dies nachgewiesen werden. Die Gesamtmenge an Proteasomen, bestehend aus konstitutiven und Immunoproteasomen, stieg nach IFN γ -Stimulation transient um bis zu 25% an. Für humane Zellen sind keine Regulationsmechanismen der konstitutiven Expression proteasomaler Untereinheiten und damit der Regulation des Proteasom-Haushaltes beschrieben (vgl. Kapitel 1.5.1). Es ist daher unklar, ob in *mammalia* Zellen ein Regelkreis wie bei Hefen existiert. Dieser inhibiert über einen *negativen feed back loop* die weitere Expression von proteasomalen Untereinheiten, wenn ausreichend Proteasom-Aktivität in der Zelle vorhanden ist (vgl. Kapitel 1.5.1). Womöglich können HeLa-Zellen nicht adäquat auf die vermehrte 20S-Proteasomen-Menge aufgrund der IFN γ -Stimulation reagieren. Die im Zusammenhang mit der dualen Proteasom-These [vgl. Kapitel 1.2, (Kloetzel, 2004)] postulierte Balance der proteolytischen Aktivität könnte dadurch aus dem Gleichgewicht geraten. Die bereits beschriebenen pro-apoptotischen und anti-proliferativen Effekte von IFN γ [Reviews: (Boehm, et al., 1997; Schroder, et al., 2004)] könnten somit womöglich auch auf einer Störung der proteasomalen Homöostase in bestimmten humanen Zellen basieren.

4.5 Mögliche funktionelle Konsequenzen der transienten Immunoproteasom-Anwort

Zusammengefasst belegen die vorgelegten Experimente, dass in humanen Zellen Immunoproteasomen sehr schnell synthetisiert, aber auch sehr schnell wieder abgebaut werden. Dies entspricht den Charakteristika Cytokin-regulierter Proteine. Während der akuten Phase einer Infektion sezernieren aktivierte Lymphozyten das immunmodulatorische Cytokin IFN γ . Die Zellen im Entzündungsherd exprimieren daraufhin u.a. proteasomale Immununtereinheiten, die präferenziell in Precursorkomplexe eingebaut werden. Da diese Immuno-Precursorkomplexe, wie hier gezeigt, beschleunigt zu aktiven Immunoproteasomen maturieren, wird die Generierung von MHC I – Antigen sehr schnell moduliert. Infizierte Zellen werden somit effektiv erkannt und eliminiert. Ist die Infektion abgeklungen, wird IFN γ nicht mehr von aktivierten Lymphozyten freigesetzt. Damit bleibt eine weitere Synthese von Immunoproteasomen in den nicht infizierten Zellen aus, die bestehenden Immunoproteasomen werden aufgrund ihrer geringen Halbwertszeit rasch degradiert und die Zelle kehrt schnell zu ihrem 'Normalzustand' mit einer im allgemeinen ausschließlichen Expression von konstitutiven Proteasomen zurück.

Die nachgewiesene transiente Beschleunigung der Immunoproteasom-Synthese bestätigt die Erwartungen bezüglich der spezifischen Funktion dieses Proteasom-Typs bei einer frühen Immunantwort (Kloetzel, 2004). Einige Untersuchungen wiesen eine unerwartet schnelle Expression von Immunoproteasomen nach einer Infektion nach (Khan, et al., 2001; Wong and Pamer, 2003). Anhand von umfangreichen Experimenten zur Infektion von Mäusen mit dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* konnte eine ebenfalls überraschend schnelle Immunantwort nachgewiesen werden (B. Strehl, persönliche Mitteilung). Die effiziente Eliminierung des Erregers erfordert neben unspezifischen Mechanismen der Immunantwort auch eine adaptive Reaktion durch spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten. Es konnte eine stark erhöhte Generierung *Listeria*-spezifischer Epitope durch Proteasomen, die zwei Tage nach Infektion isoliert wurden, gezeigt werden. Die Generierung dieser Epitope erforderte die IFN γ -induzierte Expression von Immunoproteasomen in Zellen nicht-lymphoider Organe wie Leber oder Dickdarm. Diese Ergebnisse korrelieren mit der hier beschriebenen schnellen Induktion von Immunoproteasomen. Somit sichern die unterschiedlichen Kinetiken der Assemblierung und des Abbaus von Immunoproteasomen eine schnelle, aber transiente adaptive Immunantwort auf der Ebene der Prozessierung von MHC I-Epitopen. Das funktionelle Zusammenspiel der IFN γ -induzierbaren Proteasom-Komponenten POMP und LMP7 wurde hier erstmals als eine Voraussetzung der Modulation der zellulären Immunantwort aufgrund der schnellen *de novo* Formation von Immunoproteasomen beschrieben.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aki, M.; Shimbara, N.; Takashina, M.; Akiyama, K.; Kagawa, S.; Tamura, T.; Tanahashi, N.; Yoshimura, T.; Tanaka, K. and Ichihara, A. (1994): Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes, *J Biochem (Tokyo)* 115 [2], pp. 257-69.
- Akioka, H.; Forsberg, N. E.; Ishida, N.; Okumura, K.; Nogami, M.; Taguchi, H.; Noda, C. and Tanaka, K. (1995): Isolation and characterization of the HC8 subunit gene of the human proteasome, *Biochem Biophys Res Commun* 207 [1], pp. 318-23.
- Apcher, G. S.; Maitland, J.; Dawson, S.; Sheppard, P. and Mayer, R. J. (2004): The alpha4 and alpha7 subunits and assembly of the 20S proteasome, *FEBS Lett* 569 [1-3], pp. 211-6.
- Arendt, C. S. and Hochstrasser, M. (1999): Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly, *Embo J* 18 [13], pp. 3575-85.
- Atkins, D.; Breuckmann, A.; Schmahl, G. E.; Binner, P.; Ferrone, S.; Krummenauer, F.; Storkel, S. and Seliger, B. (2004): MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma, *Int J Cancer* 109 [2], pp. 265-73.
- Barton, L. F.; Cruz, M.; Rangwala, R.; Deepe, G. S., Jr. and Monaco, J. J. (2002): Regulation of immunoproteasome subunit expression in vivo following pathogenic fungal infection, *J Immunol* 169 [6], pp. 3046-52.
- Bochtler, M.; Ditzel, L.; Groll, M.; Hartmann, C. and Huber, R. (1999): The proteasome, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, pp. 295-317.
- Boehm, U.; Klamp, T.; Groot, M. and Howard, J. C. (1997): Cellular responses to interferon-gamma, *Annu Rev Immunol* 15, pp. 749-95.
- Boes, B.; Hengel, H.; Ruppert, T.; Multhaup, G.; Koszinowski, U. H. and Kloetzel, P. M. (1994): Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes, *J Exp Med* 179 [3], pp. 901-9.
- Bose, S.; Brooks, P.; Mason, G. G. and Rivett, A. J. (2001): gamma-Interferon decreases the level of 26 S proteasomes and changes the pattern of phosphorylation, *Biochem J* 353 [Pt 2], pp. 291-7.
- Boston, P. F.; Jackson, P.; Kynoch, P. A. and Thompson, R. J. (1982): Purification, properties, and immunohistochemical localisation of human brain 14-3-3 protein, *J Neurochem* 38 [5], pp. 1466-74.
- Brooks, P.; Murray, R. Z.; Mason, G. G.; Hendil, K. B. and Rivett, A. J. (2000): Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum, *Biochem J* 352 Pt 3, pp. 611-5.
- Brown, M. G.; Driscoll, J. and Monaco, J. J. (1991): Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes, *Nature* 353 [6342], pp. 355-7.
- Burri, L.; Hockendorff, J.; Boehm, U.; Klamp, T.; Dohmen, R. J. and Levy, F. (2000): Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [19], pp. 10348-53.
- Cabrera, C. M.; Jimenez, P.; Cabrera, T.; Esparza, C.; Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F. (2003): Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors, *Tissue Antigens* 61 [3], pp. 211-9.
- Cabrera, C. M.; Jimenez, P.; Concha, A.; Garrido, F. and Ruiz-Cabello, F. (2004): Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are disorganized in colorectal tumors with total loss of major histocompatibility complex class I expression and LMP7 downregulation, *Tissue Antigens* 63 [5], pp. 446-52.
- Cagney, G.; Uetz, P. and Fields, S. (2001): Two-hybrid analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* 26S proteasome, *Physiol Genomics* 7 [1], pp. 27-34.
- Cardozo, C.; Vinitsky, A.; Hidalgo, M. C.; Michaud, C. and Orlowski, M. (1992): A 3,4-dichloroisocoumarin-resistant component of the multicatalytic proteinase complex, *Biochemistry* 31 [32], pp. 7373-80.
- Cascio, P.; Hilton, C.; Kisselev, A. F.; Rock, K. L. and Goldberg, A. L. (2001): 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide, *Embo J* 20 [10], pp. 2357-66.
- Castano, J. G.; Mahillo, E.; Arizti, P. and Arribas, J. (1996): Phosphorylation of C8 and C9 subunits of the multicatalytic proteinase by casein kinase II and identification of the C8 phosphorylation sites by direct mutagenesis, *Biochemistry* 35 [12], pp. 3782-9.
- Cerundolo, V.; Kelly, A.; Elliott, T.; Trowsdale, J. and Townsend, A. (1995): Genes encoded in the major histocompatibility complex affecting the generation of peptides for TAP transport, *Eur J Immunol* 25 [2], pp. 554-62.
- Chatterjee-Kishore, M.; van Den Akker, F. and Stark, G. R. (2000): Adenovirus E1A down-regulates LMP2 transcription by interfering with the binding of stat1 to IRF1, *J Biol Chem* 275 [27], pp. 20406-11.
- Chatterjee-Kishore, M.; Wright, K. L.; Ting, J. P. and Stark, G. R. (2000): How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene, *Embo J* 19 [15], pp. 4111-22.
- Chen, P. and Hochstrasser, M. (1995): Biogenesis, structure and function of the yeast 20S proteasome, *Embo*

- J 14 [11], pp. 2620-30.
- Chen, P. and Hochstrasser, M. (1996): Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly, *Cell* 86 [6], pp. 961-72.
- Claverol, S.; Burlet-Schiltz, O.; Girbal-Neuhausser, E.; Gairin, J. E. and Monsarrat, B. (2002): Mapping and structural dissection of human 20 S proteasome using proteomic approaches, *Mol Cell Proteomics* 1 [8], pp. 567-78.
- Conconi, M.; Petropoulos, I.; Emod, I.; Turlin, E.; Biville, F. and Friguet, B. (1998): Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90, *Biochem J* 333 (Pt 2), pp. 407-15.
- Connell, P.; Ballinger, C. A.; Jiang, J.; Wu, Y.; Thompson, L. J.; Hohfeld, J. and Patterson, C. (2001): The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins, *Nat Cell Biol* 3 [1], pp. 93-6.
- Coux, O.; Tanaka, K. and Goldberg, A. L. (1996): Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes, *Annu Rev Biochem* 65, pp. 801-47.
- Cruz, M.; Elenich, L. A.; Smolarek, T. A.; Menon, A. G. and Monaco, J. J. (1997): DNA sequence, chromosomal localization, and tissue expression of the mouse proteasome subunit Imp10 (Psm10) gene, *Genomics* 45 [3], pp. 618-22.
- Cuervo, A. M.; Palmer, A.; Rivett, A. J. and Knecht, E. (1995): Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver, *Eur J Biochem* 227 [3], pp. 792-800.
- Dahlmann, B.; Kopp, F.; Kuehn, L.; Reinauer, H. and Schwenen, M. (1986): Studies on the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle, *Biomed Biochim Acta* 45 [11-12], pp. 1493-501.
- Dahlmann, B.; Kuehn, L.; Grziwa, A.; Zwickl, P. and Baumeister, W. (1992): Biochemical properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*, *Eur J Biochem* 208 [3], pp. 789-97.
- Dahlmann, B.; Ruppert, T.; Kloetzel, P. M. and Kuehn, L. (2001): Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle, *Biochimie* 83 [3-4], pp. 295-9.
- Dahlmann, B.; Ruppert, T.; Kuehn, L.; Merforth, S. and Kloetzel, P. M. (2000): Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties, *J Mol Biol* 303 [5], pp. 643-53.
- Davy, A.; Bello, P.; Thierry-Mieg, N.; Vaglio, P.; Hitti, J.; Doucette-Stamm, L.; Thierry-Mieg, D.; Reboul, J.; Boulton, S.; Walhout, A. J.; Coux, O. and Vidal, M. (2001): A protein-protein interaction map of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome, *EMBO Rep* 2 [9], pp. 821-8.
- De, M.; Jayarapu, K.; Elenich, L.; Monaco, J. J.; Colbert, R. A. and Griffin, T. A. (2003): Beta 2 subunit propeptides influence cooperative proteasome assembly, *J Biol Chem* 278 [8], pp. 6153-9.
- Dick, T. P.; Nussbaum, A. K.; Deeg, M.; Heinemeyer, W.; Groll, M.; Schirle, M.; Keilholz, W.; Stevanovic, S.; Wolf, D. H.; Huber, R.; Rammensee, H. G. and Schild, H. (1998): Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants, *J Biol Chem* 273 [40], pp. 25637-46.
- Ding, H.; Cheng, H.; Fu, Z.; Yan, L. and Yang, G. (2001): Relationship of large multifunctional proteasome 7 gene polymorphism with susceptibility to type 1 diabetes mellitus and DR3 gene, *Chin Med J (Engl)* 114 [12], pp. 1263-6.
- Dovhey, S. E.; Ghosh, N. S. and Wright, K. L. (2000): Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line, *Cancer Res* 60 [20], pp. 5789-96.
- Driscoll, J.; Brown, M. G.; Finley, D. and Monaco, J. J. (1993): MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome, *Nature* 365 [6443], pp. 262-4.
- Du, J.; Mitch, W. E.; Wang, X. and Price, S. R. (2000): Glucocorticoids induce proteasome C3 subunit expression in L6 muscle cells by opposing the suppression of its transcription by NF-kappa B, *J Biol Chem* 275 [26], pp. 19661-6.
- Dubiel, W.; Pratt, G.; Ferrell, K. and Rechsteiner, M. (1992): Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease, *J Biol Chem* 267 [31], pp. 22369-77.
- Egerer, K.; Kuckelkorn, U.; Rudolph, P. E.; Ruckert, J. C.; Dorner, T.; Burmester, G. R.; Kloetzel, P. M. and Feist, E. (2002): Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases, *J Rheumatol* 29 [10], pp. 2045-52.
- Ehrlich, R. (1997): Modulation of antigen processing and presentation by persistent virus infections and in tumors, *Hum Immunol* 54 [2], pp. 104-16.
- Eleuteri, A. M.; Kohanski, R. A.; Cardozo, C. and Orlowski, M. (1997): Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity, *J Biol Chem* 272 [18], pp. 11824-31.
- Faucz, F. R.; Probst, C. M. and Petzl-Erler, M. L. (2000): Polymorphism of LMP2, TAP1, LMP7 and TAP2 in Brazilian Amerindians and Caucasoids: implications for the evolution of allelic and haplotypic diversity, *Eur J Immunogenet* 27 [1], pp. 5-16.
- Fehling, H. J.; Swat, W.; Laplace, C.; Kuhn, R.; Rajewsky, K.; Muller, U. and von Boehmer, H. (1994): MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7, *Science* 265 [5176], pp. 1234-7.
- Fernandez Murray, P.; Pardo, P. S.; Zelada, A. M. and Passeron, S. (2002): In vivo and in vitro phosphorylation of *Candida albicans* 20S proteasome, *Arch Biochem Biophys* 404 [1], pp. 116-25.
- Finley, D.; Ozkaynak, E. and Varshavsky, A. (1987): The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses, *Cell* 48 [6], pp. 1035-46.
- Fleming, J. A.; Lightcap, E. S.; Sadis, S.; Thoroddsen, V.; Bulawa, C. E. and Blackman, R. K. (2002):

- Complementary whole-genome technologies reveal the cellular response to proteasome inhibition by PS-341, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [3], pp. 1461-6.
- Foss, G. S. and Prydz, H. (1999): Interferon regulatory factor 1 mediates the interferon-gamma induction of the human immunoproteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1, *J Biol Chem* 274 [49], pp. 35196-202.
- Fraile, A.; Nieto, A.; Vinasco, J.; Beraun, Y.; Martin, J. and Mataran, L. (1998): Association of large molecular weight proteasome 7 gene polymorphism with ankylosing spondylitis, *Arthritis Rheum* 41 [3], pp. 560-2.
- Frentzel, S.; Pesold-Hurt, B.; Seelig, A. and Kloetzel, P. M. (1994): 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes, *J Mol Biol* 236 [4], pp. 975-81.
- Fruh, K.; Gossen, M.; Wang, K.; Bujard, H.; Peterson, P. A. and Yang, Y. (1994): Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex, *Embo J* 13 [14], pp. 3236-44.
- Fruh, K.; Yang, Y.; Arnold, D.; Chambers, J.; Wu, L.; Waters, J. B.; Spies, T. and Peterson, P. A. (1992): Alternative exon usage and processing of the major histocompatibility complex-encoded proteasome subunits, *J Biol Chem* 267 [31], pp. 22131-40.
- Frydman, J. (2001): Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones, *Annu Rev Biochem* 70, pp. 603-47.
- Fu, H.; Subramanian, R. R. and Masters, S. C. (2000): 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, pp. 617-47.
- Garcia-Lora, A.; Algarra, I. and Garrido, F. (2003): MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape, *J Cell Physiol* 195 [3], pp. 346-55.
- Gerards, W. L.; de Jong, W. W.; Bloemendal, H. and Boelens, W. (1998): The human proteasomal subunit HsC8 induces ring formation of other alpha-type subunits, *J Mol Biol* 275 [1], pp. 113-21.
- Gerards, W. L.; de Jong, W. W.; Boelens, W. and Bloemendal, H. (1998): Structure and assembly of the 20S proteasome, *Cell Mol Life Sci* 54 [3], pp. 253-62.
- Gerards, W. L.; Enzlin, J.; Haner, M.; Hendriks, I. L.; Aebi, U.; Bloemendal, H. and Boelens, W. (1997): The human alpha-type proteasomal subunit HsC8 forms a double ringlike structure, but does not assemble into proteasome-like particles with the beta-type subunits HsDelta or HsBPROS26, *J Biol Chem* 272 [15], pp. 10080-6.
- Glickman, M. H. and Ciechanover, A. (2002): The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol Rev* 82 [2], pp. 373-428.
- Glickman, M. H.; Rubin, D. M.; Fried, V. A. and Finley, D. (1998): The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome, *Mol Cell Biol* 18 [6], pp. 3149-62.
- Glynne, R.; Kerr, L. A.; Mockridge, I.; Beck, S.; Kelly, A. and Trowsdale, J. (1993): The major histocompatibility complex-encoded proteasome component LMP7: alternative first exons and post-translational processing, *Eur J Immunol* 23 [4], pp. 860-6.
- Glynne, R.; Powis, S. H.; Beck, S.; Kelly, A.; Kerr, L. A. and Trowsdale, J. (1991): A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC, *Nature* 353 [6342], pp. 357-60.
- Griffin, T. A.; Nandi, D.; Cruz, M.; Fehling, H. J.; Kaer, L. V.; Monaco, J. J. and Colbert, R. A. (1998): Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits, *J Exp Med* 187 [1], pp. 97-104.
- Griffin, T. A.; Slack, J. P.; McCluskey, T. S.; Monaco, J. J. and Colbert, R. A. (2000): Identification of proteasemblin, a mammalian homologue of the yeast protein, Ump1p, that is required for normal proteasome assembly, *Mol Cell Biol Res Commun* 3 [4], pp. 212-7.
- Groettrup, M.; Khan, S.; Schwarz, K. and Schmidtke, G. (2001): Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why?, *Biochimie* 83 [3-4], pp. 367-72.
- Groettrup, M.; Kraft, R.; Kostka, S.; Standera, S.; Stohwasser, R. and Kloetzel, P. M. (1996): A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome, *Eur J Immunol* 26 [4], pp. 863-9.
- Groettrup, M.; Standera, S.; Stohwasser, R. and Kloetzel, P. M. (1997): The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [17], pp. 8970-5.
- Groll, M.; Bajorek, M.; Kohler, A.; Moroder, L.; Rubin, D. M.; Huber, R.; Glickman, M. H. and Finley, D. (2000): A gated channel into the proteasome core particle, *Nat Struct Biol* 7 [11], pp. 1062-7.
- Groll, M.; Brandstetter, H.; Bartunik, H.; Bourenkow, G. and Huber, R. (2003): Investigations on the maturation and regulation of archaeobacterial proteasomes, *J Mol Biol* 327 [1], pp. 75-83.
- Groll, M.; Ditzel, L.; Lowe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, H. D. and Huber, R. (1997): Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature* 386 [6624], pp. 463-71.
- Groll, M.; Heinemeyer, W.; Jager, S.; Ullrich, T.; Bochtler, M.; Wolf, D. H. and Huber, R. (1999): The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [20], pp. 10976-83.
- Grziwa, A.; Baumeister, W.; Dahlmann, B. and Kopp, F. (1991): Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy, *FEBS Lett* 290 [1-2], pp. 186-90.
- Grziwa, A.; Maack, S.; Puhler, G.; Wiegand, G.; Baumeister, W. and Jaenicke, R. (1994): Dissociation and

- reconstitution of the Thermoplasma proteasome, *Eur J Biochem* 223 [3], pp. 1061-7.
- Gusarova, V.; Caplan, A. J.; Brodsky, J. L. and Fisher, E. A. (2001): Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones hsp90 and hsp70, *J Biol Chem* 276 [27], pp. 24891-900.
- Heath, W. R.; Belz, G. T.; Behrens, G. M.; Smith, C. M.; Forehan, S. P.; Parish, I. A.; Davey, G. M.; Wilson, N. S.; Carbone, F. R. and Villadangos, J. A. (2004): Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens, *Immunol Rev* 199, pp. 9-26.
- Heinemeyer, W.; Ramos, P. C. and Dohmen, R. J. (2004): The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core, *Cell Mol Life Sci* 61 [13], pp. 1562-78.
- Hendil, K. B. (1988): The 19 S multicatalytic "prosome" proteinase is a constitutive enzyme in HeLa cells, *Biochem Int* 17 [3], pp. 471-7.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem* 67, pp. 425-79.
- Heward, J. M.; Allahabadia, A.; Sheppard, M. C.; Barnett, A. H.; Franklyn, J. A. and Gough, S. C. (1999): Association of the large multifunctional proteasome (LMP2) gene with Graves' disease is a result of linkage disequilibrium with the HLA haplotype DRB1*0304-DQB1*02-DQA1*0501, *Clin Endocrinol (Oxf)* 51 [1], pp. 115-8.
- Hisamatsu, H.; Shimbara, N.; Saito, Y.; Kristensen, P.; Hendil, K. B.; Fujiwara, T.; Takahashi, E.; Tanahashi, N.; Tamura, T.; Ichihara, A. and Tanaka, K. (1996): Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma, *J Exp Med* 183 [4], pp. 1807-16.
- Huang, L.; Shen, M.; Chernushevich, I.; Burlingame, A. L.; Wang, C. C. and Robertson, C. D. (1999): Identification and isolation of three proteasome subunits and their encoding genes from *Trypanosoma brucei*, *Mol Biochem Parasitol* 102 [2], pp. 211-23.
- Hughes, A. L. (1997): Evolution of the proteasome components, *Immunogenetics* 46 [2], pp. 82-92.
- Imai, J.; Maruya, M.; Yashiroda, H.; Yahara, I. and Tanaka, K. (2003): The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome, *Embo J* 22 [14], pp. 3557-67.
- Ishii, T.; Udono, H.; Yamano, T.; Ohta, H.; Uenaka, A.; Ono, T.; Hizuta, A.; Tanaka, N.; Srivastava, P. K. and Nakayama, E. (1999): Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96, *J Immunol* 162 [3], pp. 1303-9.
- Iwafune, Y.; Kawasaki, H. and Hirano, H. (2002): Electrophoretic analysis of phosphorylation of the yeast 20S proteasome, *Electrophoresis* 23 [2], pp. 329-38.
- Jager, S.; Groll, M.; Huber, R.; Wolf, D. H. and Heinemeyer, W. (1999): Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function, *J Mol Biol* 291 [4], pp. 997-1013.
- Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M. and Shlomchik, M. J. (2001): Immunobiology: the immune system in health and disease, 5. ed., Garland Publishing, New York, ISBN: 0 8153 3642 X.
- Jayarapu, K. and Griffin, T. A. (2004): Protein-protein interactions among human 20S proteasome subunits and proteasemblin, *Biochem Biophys Res Commun* 314 [2], pp. 523-8.
- Jessenberger, V. and Jentsch, S. (2002): Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 [2], pp. 112-21.
- Kang, J. K.; Yoon, S. J.; Kim, N. K. and Heo, D. S. (2000): The expression of MHC class I, TAP1/2, and LMP2/7 gene in human gastric cancer cell lines, *Int J Oncol* 16 [6], pp. 1159-63.
- Kelly, A.; Powis, S. H.; Glynne, R.; Radley, E.; Beck, S. and Trowsdale, J. (1991): Second proteasome-related gene in the human MHC class II region, *Nature* 353 [6345], pp. 667-8.
- Khan, S.; van den Broek, M.; Schwarz, K.; de Giuli, R.; Diener, P. A. and Groettrup, M. (2001): Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver, *J Immunol* 167 [12], pp. 6859-68.
- Khong, H. T. and Restifo, N. P. (2002): Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes, *Nat Immunol* 3 [11], pp. 999-1005.
- Kingsbury, D. J.; Griffin, T. A. and Colbert, R. A. (2000): Novel propeptide function in 20 S proteasome assembly influences beta subunit composition, *J Biol Chem* 275 [31], pp. 24156-62.
- Kloetzel, P. M. (2001): Antigen processing by the proteasome, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 [3], pp. 179-87.
- Kloetzel, P. M. (2004): Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII, *Nat Immunol* 5 [7], pp. 661-9.
- Knuehl, C.; Seelig, A.; Brecht, B.; Henklein, P. and Kloetzel, P. M. (1996): Functional analysis of eukaryotic 20S proteasome nuclear localization signal, *Exp Cell Res* 225 [1], pp. 67-74.
- Kruger, E.; Kloetzel, P. M. and Enenkel, C. (2001): 20S proteasome biogenesis, *Biochimie* 83 [3-4], pp. 289-93.
- Kruger, E.; Kuckelkorn, U.; Sijts, A. and Kloetzel, P. M. (2003): The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148, pp. 81-104.
- Kuckelkorn, U.; Frentzel, S.; Kraft, R.; Kostka, S.; Groettrup, M. and Kloetzel, P. M. (1995): Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma, *Eur J Immunol* 25 [9], pp. 2605-11.
- Kuckelkorn, U.; Knuehl, C.; Boes-Fabian, B.; Drung, I. and Kloetzel, P. M. (2000): The effect of heat shock on 20S/26S proteasomes, *Biol Chem* 381 [9-10], pp. 1017-23.
- Kwon, Y. D.; Nagy, I.; Adams, P. D.; Baumeister, W. and Jap, B. K. (2004): Crystal structures of the

- Rhodococcus proteasome with and without its pro-peptides: implications for the role of the pro-peptide in proteasome assembly, *J Mol Biol* 335 [1], pp. 233-45.
- Lee, H. J.; Ha, S. J.; Han, H. and Kim, J. W. (2001): Distribution of HLA-A, B alleles and polymorphisms of TAP and LMP genes in Korean patients with atopic dermatitis, *Clin Exp Allergy* 31 [12], pp. 1867-74.
- London, M. K.; Keck, B. I.; Ramos, P. C. and Dohmen, R. J. (2004): Regulatory mechanisms controlling biogenesis of ubiquitin and the proteasome, *FEBS Lett* 567 [2-3], pp. 259-64.
- Lowe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumeister, W. and Huber, R. (1995): Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution, *Science* 268 [5210], pp. 533-9.
- Ludemann, R.; Lerea, K. M. and Etlinger, J. D. (1993): Copurification of casein kinase II with 20 S proteasomes and phosphorylation of a 30-kDa proteasome subunit, *J Biol Chem* 268 [23], pp. 17413-7.
- Lupas, A.; Zuhl, F.; Tamura, T.; Wolf, S.; Nagy, I.; De Mot, R. and Baumeister, W. (1997): Eubacterial proteasomes, *Mol Biol Rep* 24 [1-2], pp. 125-31.
- Lupas, A.; Zwickl, P.; Wenzel, T.; Seemuller, E. and Baumeister, W. (1995): Structure and function of the 20S proteasome and of its regulatory complexes, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, pp. 515-24.
- Ma, C. P.; Slaughter, C. A. and DeMartino, G. N. (1992): Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain), *J Biol Chem* 267 [15], pp. 10515-23.
- Macagno, A.; Gilliet, M.; Sallusto, F.; Lanzavecchia, A.; Nestle, F. O. and Groettrup, M. (1999): Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation, *Eur J Immunol* 29 [12], pp. 4037-42.
- Machiels, B. M.; Henfling, M. E.; Broers, J. L.; Hendil, K. B. and Ramekers, F. C. (1995): Changes in immunocytochemical detectability of proteasome epitopes depending on cell growth and fixation conditions of lung cancer cell lines, *Eur J Cell Biol* 66 [3], pp. 282-92.
- Mackintosh, C. (2004): Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes, *Biochem J* 381 [Pt 2], pp. 329-42.
- Maksymowych, W. P.; Tao, S.; Luong, M.; Suarez-Almazor, M.; Nelson, R.; Pazderka, F. and Russell, A. S. (1995): Polymorphism in the LMP2 and LMP7 genes and adult rheumatoid arthritis: no relationship with disease susceptibility or outcome, *Tissue Antigens* 46 [2], pp. 136-9.
- Mannhaupt, G.; Schnall, R.; Karpov, V.; Vetter, I. and Feldmann, H. (1999): Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast, *FEBS Lett* 450 [1-2], pp. 27-34.
- Martinez, C. K. and Monaco, J. J. (1991): Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene, *Nature* 353 [6345], pp. 664-7.
- Mason, G. G.; Hendil, K. B. and Rivett, A. J. (1996): Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Identification of two phosphorylated subunits and the effect of phosphorylation on activity, *Eur J Biochem* 238 [2], pp. 453-62.
- Maupin-Furlow, J. A.; Aldrich, H. C. and Ferry, J. G. (1998): Biochemical characterization of the 20S proteasome from the methanarchaeon *Methanosarcina thermophila*, *J Bacteriol* 180 [6], pp. 1480-7.
- McKinsey, T. A.; Zhang, C. L. and Olson, E. N. (2001): Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases, *Mol Cell Biol* 21 [18], pp. 6312-21.
- Meiners, S.; Heyken, D.; Weller, A.; Ludwig, A.; Stangl, K.; Kloetzel, P. M. and Kruger, E. (2003): Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes, *J Biol Chem* 278 [24], pp. 21517-25.
- Meinhardt, T.; Graf, U. and Hammerling, G. J. (1993): Different genomic structure of mouse and human Lmp7 genes: characterization of MHC-encoded proteasome genes, *Immunogenetics* 38 [5], pp. 373-9.
- Merla, G.; Howald, C.; Antonarakis, S. E. and Reymond, A. (2004): The subcellular localization of the ChoRE-binding protein, encoded by the Williams-Beuren syndrome critical region gene 14, is regulated by 14-3-3, *Hum Mol Genet* 13 [14], pp. 1505-14.
- Miyagi, T.; Tatsumi, T.; Takehara, T.; Kanto, T.; Kuzushita, N.; Sugimoto, Y.; Jinushi, M.; Kasahara, A.; Sasaki, Y.; Hori, M. and Hayashi, N. (2003): Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells, *J Gastroenterol Hepatol* 18 [1], pp. 32-40.
- Montel, V.; Gardrat, F.; Azanza, J. L. and Raymond, J. (1999): 20S proteasome, hsp90, p97 fusion protein, PA28 activator copurifying oligomers and ATPase activities, *Biochem Mol Biol Int* 47 [3], pp. 465-72.
- Morel, S.; Levy, F.; Bulet-Schiltz, O.; Brasseur, F.; Probst-Keppler, M.; Peitrequin, A. L.; Monsarrat, B.; Van Velthoven, R.; Cerottini, J. C.; Boon, T.; Gairin, J. E. and Van den Eynde, B. J. (2000): Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells, *Immunity* 12 [1], pp. 107-17.
- Muelhardt, C. (1999): *Der Experimentator: Molekularbiologie*, 1. Auflage, ed., G. Fischer Verlag.
- Murata, S.; Udono, H.; Tanahashi, N.; Hamada, N.; Watanabe, K.; Adachi, K.; Yamano, T.; Yui, K.; Kobayashi, N.; Kasahara, M.; Tanaka, K. and Chiba, T. (2001): Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28alpha and PA28beta, *Embo J* 20 [21], pp. 5898-907.
- Muslin, A. J.; Tanner, J. W.; Allen, P. M. and Shaw, A. S. (1996): Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine, *Cell* 84 [6], pp. 889-97.
- Muslin, A. J. and Xing, H. (2000): 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference, *Cell Signal* 12 [11-12], pp. 703-9.
- Nandi, D.; Jiang, H. and Monaco, J. J. (1996): Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-

- inducible proteasome subunit, *J Immunol* 156 [7], pp. 2361-4.
- Nandi, D.; Woodward, E.; Ginsburg, D. B. and Monaco, J. J. (1997): Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits, *Embo J* 16 [17], pp. 5363-75.
- Naruse, T. K.; Matsuzawa, Y.; Ota, M.; Katsuyama, Y.; Matsumori, A.; Hara, M.; Nagai, S.; Morimoto, S.; Sasayama, S. and Inoko, H. (2000): HLA-DQB1*0601 is primarily associated with the susceptibility to cardiac sarcoidosis, *Tissue Antigens* 56 [1], pp. 52-7.
- Noda, C.; Tanahashi, N.; Shimbara, N.; Hendil, K. B. and Tanaka, K. (2000): Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats, *Biochem Biophys Res Commun* 277 [2], pp. 348-54.
- Nussbaum, A. K.; Dick, T. P.; Keilholz, W.; Schirle, M.; Stevanovic, S.; Dietz, K.; Heinemeyer, W.; Groll, M.; Wolf, D. H.; Huber, R.; Rammensee, H. G. and Schild, H. (1998): Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [21], pp. 12504-9.
- Olson, T. S. and Dice, J. F. (1989): Regulation of protein degradation rates in eukaryotes, *Curr Opin Cell Biol* 1 [6], pp. 1194-200.
- Orlowski, M.; Cardozo, C. and Michaud, C. (1993): Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids, *Biochemistry* 32 [6], pp. 1563-72.
- Orlowski, M. and Wilk, S. (2000): Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex, *Arch Biochem Biophys* 383 [1], pp. 1-16.
- Ortiz-Navarrete, V.; Seelig, A.; Gernold, M.; Frentzel, S.; Kloetzel, P. M. and Hammerling, G. J. (1991): Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex, *Nature* 353 [6345], pp. 662-4.
- Palombella, V. J.; Rando, O. J.; Goldberg, A. L. and Maniatis, T. (1994): The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B, *Cell* 78 [5], pp. 773-85.
- Perkins, G. A.; Bergsma-Schutter, W.; Keegstra, W.; Arnberg, A. C.; Coux, O. and Scherrer, K. (1994): The 1.5-nm projection structure of HeLa cell prosome-MCP (proteasome) provided by two-dimensional crystals, *J Struct Biol* 113 [2], pp. 124-34.
- Prahalad, S.; Kingsbury, D. J.; Griffin, T. A.; Cooper, B. L.; Glass, D. N.; Maksymowych, W. P. and Colbert, R. A. (2001): Polymorphism in the MHC-encoded LMP7 gene: association with JRA without functional significance for immunoproteasome assembly, *J Rheumatol* 28 [10], pp. 2320-5.
- Preckel, T.; Fung-Leung, W. P.; Cai, Z.; Vitiello, A.; Salter-Cid, L.; Winqvist, O.; Wolfe, T. G.; Von Herrath, M.; Angulo, A.; Ghazal, P.; Lee, J. D.; Fourie, A. M.; Wu, Y.; Pang, J.; Ngo, K.; Peterson, P. A.; Fruh, K. and Yang, Y. (1999): Impaired immunoproteasome assembly and immune responses in PA28-/- mice, *Science* 286 [5447], pp. 2162-5.
- Price, S. R.; Bailey, J. L.; Wang, X.; Jurkovitz, C.; England, B. K.; Ding, X.; Phillips, L. S. and Mitch, W. E. (1996): Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription, *J Clin Invest* 98 [8], pp. 1703-8.
- Proffitt, J. A. and Blair, G. E. (1997): The MHC-encoded TAP1/LMP2 bidirectional promoter is down-regulated in highly oncogenic adenovirus type 12 transformed cells, *FEBS Lett* 400 [2], pp. 141-4.
- Puhler, G.; Weinkauff, S.; Bachmann, L.; Muller, S.; Engel, A.; Hegerl, R. and Baumeister, W. (1992): Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*, *Embo J* 11 [4], pp. 1607-16.
- Rammensee, H. G. (1995): Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules, *Curr Opin Immunol* 7 [1], pp. 85-96.
- Ramos, P. C.; Hockendorff, J.; Johnson, E. S.; Varshavsky, A. and Dohmen, R. J. (1998): Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly, *Cell* 92 [4], pp. 489-99.
- Ramos, P. C.; Marques, A. J.; London, M. K. and Dohmen, R. J. (2004): Role of C-terminal extensions of subunits beta2 and beta7 in assembly and activity of eukaryotic proteasomes, *J Biol Chem* 279 [14], pp. 14323-30.
- Realini, C.; Dubiel, W.; Pratt, G.; Ferrell, K. and Rechsteiner, M. (1994): Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease, *J Biol Chem* 269 [32], pp. 20727-32.
- Realini, C.; Rogers, S. W. and Rechsteiner, M. (1994): KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors, *FEBS Lett* 348 [2], pp. 109-13.
- Reits, E. A.; Benham, A. M.; Plougastel, B.; Neeffes, J. and Trowsdale, J. (1997): Dynamics of proteasome distribution in living cells, *Embo J* 16 [20], pp. 6087-94.
- Restifo, N. P.; Esquivel, F.; Kawakami, Y.; Yewdell, J. W.; Mule, J. J.; Rosenberg, S. A. and Bennink, J. R. (1993): Identification of human cancers deficient in antigen processing, *J Exp Med* 177 [2], pp. 265-72.
- Rock, K. L. and Goldberg, A. L. (1999): Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides, *Annu Rev Immunol* 17, pp. 739-79.

- Rock, K. L.; York, I. A. and Goldberg, A. L. (2004): Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation, *Nat Immunol* 5 [7], pp. 670-7.
- Rock, K. L.; York, I. A.; Saric, T. and Goldberg, A. L. (2002): Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides, *Adv Immunol* 80, pp. 1-70.
- Rodriguez-Vilarino, S.; Arribas, J.; Arizti, P. and Castano, J. G. (2000): Proteolytic processing and assembly of the C5 subunit into the proteasome complex, *J Biol Chem* 275 [9], pp. 6592-9.
- Salter, R. D. and Cresswell, P. (1986): Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid, *Embo J* 5 [5], pp. 943-9.
- Salzmann, U.; Kral, S.; Braun, B.; Standera, S.; Schmidt, M.; Kloetzel, P. M. and Sijts, A. (1999): Mutational analysis of subunit β 2 (MECL-1) demonstrates conservation of cleavage specificity between yeast and mammalian proteasomes, *FEBS Lett* 454 [1-2], pp. 11-5.
- Scherrer, K. and Bey, F. (1994): The prosomes (multicatalytic proteinases; proteasomes) and their relationship to the untranslated messenger ribonucleoproteins, the cytoskeleton, and cell differentiation, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 49, pp. 1-64.
- Schmidt, M.; Schmidtke, G. and Kloetzel, P. M. (1997): Structure and structure formation of the 20S proteasome, *Mol Biol Rep* 24 [1-2], pp. 103-12.
- Schmidt, M.; Zantopf, D.; Kraft, R.; Kostka, S.; Preissner, R. and Kloetzel, P. M. (1999): Sequence information within proteasomal prosequences mediates efficient integration of beta-subunits into the 20 S proteasome complex, *J Mol Biol* 288 [1], pp. 117-28.
- Schmidtke, G.; Kraft, R.; Kostka, S.; Henklein, P.; Frommel, C.; Lowe, J.; Huber, R.; Kloetzel, P. M. and Schmidt, M. (1996): Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis, *Embo J* 15 [24], pp. 6887-98.
- Schmidtke, G.; Schmidt, M. and Kloetzel, P. M. (1997): Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes, *J Mol Biol* 268 [1], pp. 95-106.
- Schroder, K.; Hertzog, P. J.; Ravasi, T. and Hume, D. A. (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions, *J Leukoc Biol* 75 [2], pp. 163-89.
- Schubert, U.; Anton, L. C.; Gibbs, J.; Norbury, C. C.; Yewdell, J. W. and Bennink, J. R. (2000): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature* 404 [6779], pp. 770-4.
- Schultz, E. S.; Chapiro, J.; Lurquin, C.; Claverol, S.; Burlet-Schiltz, O.; Warnier, G.; Russo, V.; Morel, S.; Levy, F.; Boon, T.; Van den Eynde, B. J. and van der Bruggen, P. (2002): The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome, *J Exp Med* 195 [4], pp. 391-9.
- Schwarz, K.; van Den Broek, M.; Kostka, S.; Kraft, R.; Soza, A.; Schmidtke, G.; Kloetzel, P. M. and Groettrup, M. (2000): Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 α/β , enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope, *J Immunol* 165 [2], pp. 768-78.
- Seemuller, E.; Lupas, A. and Baumeister, W. (1996): Autocatalytic processing of the 20S proteasome, *Nature* 382 [6590], pp. 468-71.
- Seemuller, E.; Lupas, A.; Stock, D.; Lowe, J.; Huber, R. and Baumeister, W. (1995): Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease, *Science* 268 [5210], pp. 579-82.
- Seemuller, E.; Lupas, A.; Zuhl, F.; Zwickl, P. and Baumeister, W. (1995): The proteasome from *Thermoplasma acidophilum* is neither a cysteine nor a serine protease, *FEBS Lett* 359 [2-3], pp. 173-8.
- Sekimoto, T.; Fukumoto, M. and Yoneda, Y. (2004): 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1), *Embo J* 23 [9], pp. 1934-42.
- Seliger, B.; Atkins, D.; Bock, M.; Ritz, U.; Ferrone, S.; Huber, C. and Storkel, S. (2003): Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-processing down-regulation, *Clin Cancer Res* 9 [5], pp. 1721-7.
- Seliger, B.; Wollscheid, U.; Momburg, F.; Blankenstein, T. and Huber, C. (2000): Coordinate downregulation of multiple MHC class I antigen processing genes in chemical-induced murine tumor cell lines of distinct origin, *Tissue Antigens* 56 [4], pp. 327-36.
- Sibille, C.; Gould, K. G.; Willard-Gallo, K.; Thomson, S.; Rivett, A. J.; Powis, S.; Butcher, G. W. and De Baetselier, P. (1995): LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes, *Curr Biol* 5 [8], pp. 923-30.
- Sijts, A. J.; Ruppert, T.; Rehmann, B.; Schmidt, M.; Koszinowski, U. and Kloetzel, P. M. (2000): Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes, *J Exp Med* 191 [3], pp. 503-14.
- Sijts, A. J.; Standera, S.; Toes, R. E.; Ruppert, T.; Beekman, N. J.; van Veelen, P. A.; Ossendorp, F. A.; Melief, C. J. and Kloetzel, P. M. (2000): MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells, *J Immunol* 164 [9], pp. 4500-6.
- Singal, D. P.; Ye, M. and Quadri, S. A. (1995): Major histocompatibility-encoded human proteasome LMP2. Genomic organization and a new form of mRNA, *J Biol Chem* 270 [4], pp. 1966-70.
- Sreedhar, A. S.; Soti, C. and Csermely, P. (2004): Inhibition of Hsp90: a new strategy for inhibiting protein

- kinases, *Biochim Biophys Acta* 1697 [1-2], pp. 233-42.
- Stohwasser, R.; Salzmann, U.; Giesebrecht, J.; Kloetzel, P. M. and Holzhutter, H. G. (2000): Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28, *Eur J Biochem* 267 [20], pp. 6221-30.
- Stohwasser, R.; Standera, S.; Peters, I.; Kloetzel, P. M. and Groettrup, M. (1997): Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon-gamma-modulated proteasome subunits, *Eur J Immunol* 27 [5], pp. 1182-7.
- Sugimoto, Y.; Kuzushita, N.; Takehara, T.; Kanto, T.; Tatsumi, T.; Miyagi, T.; Jinushi, M.; Ohkawa, K.; Horimoto, M.; Kasahara, A.; Hori, M.; Sasaki, Y. and Hayashi, N. (2002): A single nucleotide polymorphism of the low molecular mass polypeptide 7 gene influences the interferon response in patients with chronic hepatitis C, *J Viral Hepat* 9 [5], pp. 377-84.
- Sun, Y.; Sijts, A. J.; Song, M.; Janek, K.; Nussbaum, A. K.; Kral, S.; Schirle, M.; Stevanovic, S.; Paschen, A.; Schild, H.; Kloetzel, P. M. and Schadendorf, D. (2002): Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells, *Cancer Res* 62 [10], pp. 2875-82.
- Suttitanamongkol, S.; Polanowska-Grabowska, R. and Gear, A. R. (2002): Heat-shock protein 90 complexes in resting and thrombin-activated platelets, *Biochem Biophys Res Commun* 297 [1], pp. 129-33.
- Tamura, T.; Nagy, I.; Lupas, A.; Lottspeich, F.; Cejka, Z.; Schoofs, G.; Tanaka, K.; De Mot, R. and Baumeister, W. (1995): The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*, *Curr Biol* 5 [7], pp. 766-74.
- Tamura, T.; Osaka, F.; Kawamura, Y.; Higuti, T.; Ishida, N.; Nothwang, H. G.; Tsurumi, C.; Tanaka, K. and Ichihara, A. (1994): Isolation and characterization of alpha-type HC3 and beta-type HC5 subunit genes of human proteasomes, *J Mol Biol* 244 [1], pp. 117-24.
- Tanaka, K. (1994): Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing, *J Leukoc Biol* 56 [5], pp. 571-5.
- Tanaka, K. and Ichihara, A. (1989): Half-life of proteasomes (multiprotease complexes) in rat liver, *Biochem Biophys Res Commun* 159 [3], pp. 1309-15.
- Tanaka, K.; Ii, K.; Ichihara, A.; Waxman, L. and Goldberg, A. L. (1986): A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution, *J Biol Chem* 261 [32], pp. 15197-203.
- Tanaka, K.; Tamura, T.; Yoshimura, T. and Ichihara, A. (1992): Proteasomes: protein and gene structures, *New Biol* 4 [3], pp. 173-87.
- Tanaka, K.; Yoshimura, T.; Tamura, T.; Fujiwara, T.; Kumatori, A. and Ichihara, A. (1990): Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes, *FEBS Lett* 271 [1-2], pp. 41-6.
- Thomson, S. and Rivett, A. J. (1996): Processing of N3, a mammalian proteasome beta-type subunit, *Biochem J* 315 (Pt 3), pp. 733-8.
- Toes, R. E.; Nussbaum, A. K.; Degermann, S.; Schirle, M.; Emmerich, N. P.; Kraft, M.; Laplace, C.; Zwinderman, A.; Dick, T. P.; Muller, J.; Schonfisch, B.; Schmid, C.; Fehling, H. J.; Stevanovic, S.; Rammensee, H. G. and Schild, H. (2001): Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products, *J Exp Med* 194 [1], pp. 1-12.
- Tsubuki, S.; Saito, Y. and Kawashima, S. (1994): Purification and characterization of an endogenous inhibitor specific to the Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading activity in proteasome and its identification as heat-shock protein 90, *FEBS Lett* 344 [2-3], pp. 229-33.
- Uchida, S.; Kuma, A.; Ohtsubo, M.; Shimura, M.; Hirata, M.; Nakagama, H.; Matsunaga, T.; Ishizaka, Y. and Yamashita, K. (2004): Binding of 14-3-3beta but not 14-3-3sigma controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B, *J Cell Sci* 117 [Pt 14], pp. 3011-20.
- Umeda, M.; Manabe, Y. and Uchimiya, H. (1997): Phosphorylation of the C2 subunit of the proteasome in rice (*Oryza sativa* L.), *FEBS Lett* 403 [3], pp. 313-7.
- Unno, M.; Mizushima, T.; Morimoto, Y.; Tomisugi, Y.; Tanaka, K.; Yasuoka, N. and Tsukihara, T. (2002): The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution, *Structure (Camb)* 10 [5], pp. 609-18.
- Ustrell, V.; Pratt, G. and Rechsteiner, M. (1995): Effects of interferon gamma and major histocompatibility complex-encoded subunits on peptidase activities of human multicatalytic proteases, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [2], pp. 584-8.
- Van den Eynde, B. J. and Morel, S. (2001): Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome, *Curr Opin Immunol* 13 [2], pp. 147-53.
- van Endert, P. M.; Lopez, M. T.; Patel, S. D.; Monaco, J. J. and McDevitt, H. O. (1992): Genomic polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium in human major histocompatibility complex-encoded antigen-processing genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 [23], pp. 11594-7.
- van Hall, T.; Sijts, A.; Camps, M.; Offringa, R.; Melief, C.; Kloetzel, P. M. and Ossendorp, F. (2000): Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28, *J Exp Med* 192 [4], pp. 483-94.
- Van Kaer, L.; Ashton-Rickardt, P. G.; Eichelberger, M.; Gaczynska, M.; Nagashima, K.; Rock, K. L.; Goldberg, A. L.; Doherty, P. C. and Tonegawa, S. (1994): Altered peptidase and viral-specific T cell response in

- LMP2 mutant mice, *Immunity* 1 [7], pp. 533-41.
- Vinasco, J.; Fraile, A.; Nieto, A.; Beraun, Y.; Pareja, E.; Mataran, L. and Martin, J. (1998): Analysis of LMP and TAP polymorphisms by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis* 57 [1], pp. 33-7.
- Voges, D.; Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999): The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis, *Annu Rev Biochem* 68, pp. 1015-68.
- Waelter, S.; Boeddrich, A.; Lurz, R.; Scherzinger, E.; Lueder, G.; Lehrach, H. and Wanker, E. E. (2001): Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation, *Mol Biol Cell* 12 [5], pp. 1393-407.
- Wagner, B. J. and Margolis, J. W. (1995): Age-dependent association of isolated bovine lens multicatalytic proteinase complex (proteasome) with heat-shock protein 90, an endogenous inhibitor, *Arch Biochem Biophys* 323 [2], pp. 455-62.
- Wehren, A.; Meyer, H. E.; Sobek, A.; Kloetzel, P. M. and Dahlmann, B. (1996): Phosphoamino acids in proteasome subunits, *Biol Chem* 377 [7-8], pp. 497-503.
- White, L. C.; Wright, K. L.; Felix, N. J.; Ruffner, H.; Reis, L. F.; Pine, R. and Ting, J. P. (1996): Regulation of LMP2 and TAP1 genes by IRF-1 explains the paucity of CD8+ T cells in IRF-1-/- mice, *Immunity* 5 [4], pp. 365-76.
- Wilk, S. and Orlowski, M. (1983): Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex, *J Neurochem* 40 [3], pp. 842-9.
- Wilson, H. L.; Aldrich, H. C. and Maupin-Furlow, J. (1999): Halophilic 20S proteasomes of the archaeon *Haloferax volcanii*: purification, characterization, and gene sequence analysis, *J Bacteriol* 181 [18], pp. 5814-24.
- Wilson, H. L.; Ou, M. S.; Aldrich, H. C. and Maupin-Furlow, J. (2000): Biochemical and physical properties of the *Methanococcus jannaschii* 20S proteasome and PAN, a homolog of the ATPase (Rpt) subunits of the eucaryal 26S proteasome, *J Bacteriol* 182 [6], pp. 1680-92.
- Witt, E.; Zantopf, D.; Schmidt, M.; Kraft, R.; Kloetzel, P. M. and Kruger, E. (2000): Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes, *J Mol Biol* 301 [1], pp. 1-9.
- Wojcik, C. and DeMartino, G. N. (2002): Analysis of *Drosophila* 26 S proteasome using RNA interference, *J Biol Chem* 277 [8], pp. 6188-97.
- Wojcik, C. and DeMartino, G. N. (2003): Intracellular localization of proteasomes, *Int J Biochem Cell Biol* 35 [5], pp. 579-89.
- Wong, P. and Pamer, E. G. (2003): Feedback regulation of pathogen-specific T cell priming, *Immunity* 18 [4], pp. 499-511.
- Wright, K. L.; White, L. C.; Kelly, A.; Beck, S.; Trowsdale, J. and Ting, J. P. (1995): Coordinate regulation of the human TAP1 and LMP2 genes from a shared bidirectional promoter, *J Exp Med* 181 [4], pp. 1459-71.
- Xie, Y. and Varshavsky, A. (2001): RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [6], pp. 3056-61.
- Yamano, T.; Murata, S.; Shimbara, N.; Tanaka, N.; Chiba, T.; Tanaka, K.; Yui, K. and Udono, H. (2002): Two distinct pathways mediated by PA28 and hsp90 in major histocompatibility complex class I antigen processing, *J Exp Med* 196 [2], pp. 185-96.
- Yang, Y.; Fruh, K.; Ahn, K. and Peterson, P. A. (1995): In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing, *J Biol Chem* 270 [46], pp. 27687-94.
- Yao, Y.; Toth, C. R.; Huang, L.; Wong, M. L.; Dias, P.; Burlingame, A. L.; Coffino, P. and Wang, C. C. (1999): alpha5 subunit in *Trypanosoma brucei* proteasome can self-assemble to form a cylinder of four stacked heptamer rings, *Biochem J* 344 Pt 2, pp. 349-58.
- York, I. A.; Goldberg, A. L.; Mo, X. Y. and Rock, K. L. (1999): Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation, *Immunol Rev* 172, pp. 49-66.
- Zaiss, D. M.; Standera, S.; Holzthutter, H.; Kloetzel, P. and Sijts, A. J. (1999): The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes, *FEBS Lett* 457 [3], pp. 333-8.
- Zaiss, D. M.; Standera, S.; Kloetzel, P. M. and Sijts, A. J. (2002): PI31 is a modulator of proteasome formation and antigen processing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [22], pp. 14344-9.
- Zuhl, F.; Seemuller, E.; Golbik, R. and Baumeister, W. (1997): Dissecting the assembly pathway of the 20S proteasome, *FEBS Lett* 418 [1-2], pp. 189-94.
- Zuhl, F.; Tamura, T.; Dolenc, I.; Cejka, Z.; Nagy, I.; De Mot, R. and Baumeister, W. (1997): Subunit topology of the *Rhodococcus* proteasome, *FEBS Lett* 400 [1], pp. 83-90.
- Zwickl, P.; Grziwa, A.; Puhler, G.; Dahlmann, B.; Lottspeich, F. and Baumeister, W. (1992): Primary structure of the *Thermoplasma* proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase, *Biochemistry* 31 [4], pp. 964-72.
- Zwickl, P.; Klein, J. and Baumeister, W. (1994): Critical elements in proteasome assembly, *Nat Struct Biol* 1 [11], pp. 765-70.
- Zwickl, P.; Lottspeich, F. and Baumeister, W. (1992): Expression of functional *Thermoplasma acidophilum* proteasomes in *Escherichia coli*, *FEBS Lett* 312 [2-3], pp. 157-60.

Anhang

BD \ AD	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 1i$	$\beta 2i$	$\beta 5i$	POMP	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	$\alpha 7$
$\beta 1$		+	+		+		+			+	+							
$\beta 2$	+		+															
$\beta 3$		+	(+)		(+)		(+)		+	(+)	(+)							
$\beta 4$			(+)		(+)		+		(+)	+	+							
$\beta 5$	(+)		+	+		(+)	+				+	+	+	(+)				
$\beta 6$			(+)				(+)			(+)	(+)						(+)	
$\beta 7$	+	+	(+)			+	+	(+)		+	(+)							
$\beta 1i$																		
$\beta 2i$			+															
$\beta 5i$	+		+			+	+	+	+	+	+							
POMP	(+)	+	+		+	+	+	+	+	+	+			+	+			+
$\alpha 1$		+						+	+		(+)		+					+
$\alpha 2$		+						+	+				+	+	+	+		+
$\alpha 3$													+	+	+			+
$\alpha 4$													+	+	+			+
$\alpha 5$															+			
$\alpha 6$										+			+	+				+
$\alpha 7$												+	+	+	+	+	+	+

Abbildung 42: Gegenüberstellung der vorgelegten *Interaction Trap*-Daten mit publizierten Protein-Protein-Interaktionen zwischen 20S-Proteasom-Untereinheiten einschließlich POMP (bzw. Ump1/Proteasassemblin) verschiedener Spezies basierend auf Hefe 2-Hybrid-Studien. 20S-Untereinheiten-Interaktionen wurden bisher beschrieben für *S.cerevisiae* [(Cagney, et al., 2001), symbolisiert durch •], *C.elegans* [(Davy, et al., 2001), gekennzeichnet durch •] und für humane Untereinheiten [(Jayarapu and Griffin, 2004) •]. Die Ergebnisse der vorgelegten, eigenen Experimente [(+), +] sind wie in Abbildung 12 symbolisiert. Nachgewiesene Kontakte zwischen α - α bzw. β - β -Untereinheiten, die im reifen 20S-Proteasom benachbart innerhalb der Heptamerringe liegen, sind gelb unterlegt. Interaktionen zwischen β -Untereinheiten, die die Interringkontakte zwischen zwei β -Heptamerringen stabilisieren könnten, sind hellgrau; α - β -Interringkontakte dunkelgrau hinterlegt.

Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Aminotriazol	AD	Aktivierungsdomäne
AF	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin	AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat	AS	Aminosäure
BD	Bindedomäne	bp	Basenpaare

BSA	<i>bovine serum albumin</i>	CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>	<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CFDA-SE	<i>carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester</i>	CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
DEAE	<i>Diethylaminoethyl</i>	DMF	<i>N,N-Dimethylformamide</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	DTT	Dithiothreitol
E1	Ub-aktivierendes Enzym	E2	Ub-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Protein-Isopeptid-Ligase	E4	Multi-Ub-Konjugationsfaktor
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	EPI	<i>early proteasome intermediates</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>	FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>	FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
IFN γ	Interferon γ	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
β -Gal	β -Galactosidase	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>	HSP	Hitzeschockprotein
IP	Immunpräzipitation	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
IVTT	<i>in vitro</i> -Transkription und Translation	kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani-Medium	LMP	<i>low molecular weight protein</i>
mAk	monoklonaler Antikörper	MCS	<i>multiple cloning site</i>
MECL-1	<i>multicatalytic endopeptidase complex-like 1</i>	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>	OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid	PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	POD	Peroxidase
POMP	<i>proteasome maturation protein</i>	RNA	Ribonukleinsäure
RNase	<i>Ribonuclease</i>	rpm	<i>rounds per minute</i>
R θ	Raumtemperatur	RT	reverse Transkription
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>	<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>T. acidophilum</i>	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>	TCR	<i>T cell receptor</i>
TE	Tris-EDTA	TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>
Tris	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>	U	<i>unit</i>
UAS	<i>upstream activating sequences</i>	Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System	UMP	<i>ubiquitin-mediated proteolysis</i>
ÜN	über Nacht	ÜNK	Übernachtkultur
v/v	<i>volume per volume</i>	w/v	<i>weigh per volume</i>
wt	Wildtyp	X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Sylvia Heink

Geburtsdatum: 08.09.1975 **Geburtsort:** Leipzig

Staatsangehörigkeit: deutsch **Familienstand:** ledig

Adresse: Sophienstr. 07, 07443 Jena

SCHULBILDUNG

1982-1984 Gottfried-Wilhelm-Leibniz-POS, Leipzig

1984-1990 Friedrich-Engels-POS, Leipzig, Klasse mit erweitertem Russischunterricht

1990-1994 Spezialschule bzw. Gymnasium (Umbenennung 1992) „Wilhelm-Ostwald“
mathematisch-naturwissenschaftlicher Profilrichtung, Leipzig; Abitur

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

Okt. 1994 – Sept. 2000 **Universität Leipzig, Studium Biologie / Diplom**

Auslandstrimester: Universität "Unicamp" Campinas / Brasilien (Okt.-Dez. 1997) Fakultät für Lebensmitteltechnologie (FEA/DEPAN), Organisation: IAESTE/DAAD

Forschungsprojektarbeit: (1998 - 1999) im Fachbereich Genetik, Universität Leipzig

Diplom-Prüfungen: Genetik, Immunbiologie, Tierphysiologie, Biochemie (1999)

Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Funktion der E3-Ligase HectH7 und ihrem potentiellen Einfluß auf den proteasomalen Abbau des Homöobox-Transkriptionsfaktors Cdx2“ (Okt. 1999 - Sept. 2000), Gastroenterologisches Labor, AG Dr. K. Caca, Universitätsklinikum Leipzig und AG Prof. M. Scheffner (DKFZ Heidelberg bzw. Institut für Biochemie, Universität Köln)

Diplom (Sept. 2000)

Dez. 2000 - Aug. 2004 **Humboldt-Universität / Charité – Universitätsmedizin Berlin**

Wissenschaftl. Mitarbeiterin (Doktorand), Institut für Biochemie, AG Prof. PM Kloetzel
Thema „Biochemische Analyse der humanen 20S-Proteasom-Assemblierung

seit Sept. 2004 **Universitätsklinikum Jena**

Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Immunologie, AG Prof. T Kamradt

PUBLIKATIONEN

Apcher GS, **Heink S**, Zantopf D, Kloetzel PM, Schmid HP, Mayer RJ, Kruger E (2003) Human immunodeficiency virus-1 Tat protein interacts with distinct proteasomal α and β subunits. FEBS Lett. 553 (1-2): 200-4.

Heink S, Ludwig D, Kloetzel PM, Kruger E (2005) IFN γ -induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. Proc Natl Acad Sci USA. 102 (26): 9241-6.

Poster

Heink S, Heyken D, Kloetzel PM, Kruger E: Immunoproteasome assembly and maturation: The influence of the 20S subunit $\beta 5i$ (LMP7) on the stability of the proteasome maturation protein POMP. April 2003 Clermont-Ferrand, Frankreich, „V. International Workshop On Proteasomes“

Vorträge

Heink S: Immunoproteasome assembly and maturation - The influence of the 20S subunit $\beta 5i$ (LMP7) on the stability of the proteasome maturation protein POMP. Mai 2003 Berlin, 5. Kolloquium des DFG-Schwerpunktprogramms „Struktur, Funktion und Regulation des 20S/26S Ubiquitin-Proteasomsystems“

Heink S: POMP (proteasome maturation protein) und die immunoproteasomale Untereinheit $\beta 5i$ (LMP7) kontrollieren die Dynamik der proteasomalen Immunadaption Dezember 2003, Institut für Biologie HU Berlin, „2. Studententag der Lebenswissenschaften“

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt den überaus engagierten Betreuern meiner Promotion Herrn Prof. P.M. Kloetzel und Frau Dr. Elke Krüger für die Überantwortung des Themas, die hervorragende Betreuung, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihre wohlmeinenden Ratschläge, die vorliegende Dissertation prägnant und stringent zu formulieren. Den Gutachtern und Mitgliedern des Promotionsausschusses sei gedankt für ihre Bereitschaft, diese Funktion auszuüben. Herrn Dr. Egerer möchte ich danken für die Proteasom-Quantifizierung, Frau Dr. Janek für die 'Masse', Frau Dr. Nagy für die HLA-Typisierung der Rko-Zellen, Herrn Prof. Monaco für die Bereitstellung des C8-Antikörpers sowie Frau Dr. Fellerhoff für die Bereitstellung der Zelllinien und die fruchtbaren 'K/Q-Diskussionen'.

Den technischen Assistentinnen der Projektgruppe 'Proteasombiogenese' Carola Beier und Daniela Zantopf ein großes Dankeschön für die außerordentlich freundliche Unterstützung. Besonders die 'Blotfee' hat durch ihre exzellente Assistenz die Experimente vor allem in der letzten 'heissen' Phase dieser Arbeit maßgeblich unterstützt. Auch den weiteren Mitgliedern der Biogenese-Gruppe Dirk Heyken, Ben Fricke und Tobias Schwarz sei herzlich gedankt für das äußerst freundschaftliche Arbeitsklima, fruchtbare Diskussionen, lebensrettende Computer-Hilfestellungen, Verständnis für meine 'Aufheben !'-Mentalität und die gelegentlichen Anregungen, auch 'mal das Labor zu verlassen. Eine harmonische und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre herrschte nicht nur in unserer Projektgruppe, sondern in der gesamten AG Kloetzel. Dafür allen Mitarbeitern, auch wenn aus Platzmangel nicht alle namentlich erwähnt sind, ein herzliches Dankeschön: Herrn Prof. Dahlmann, dem 'wandelnden Biochemie-Kompendium' Dr. Ulrike Kuckelkorn, den Postdocs Dr. Ulrike Seifert und Dr. Michael Seeger und der Besatzung des Doktorandenraums: 'Lektorin' Melanie Rieger, Annett Helfrich, Britta Strehl, Andrea Schulze und Gesa Hoffmann. Dem technischen Personal Sybille Standera, Ilse Drung, Renate Dumdey, Ingrid Krenz und Elke Bürger sei gedankt für ihre freundliche Unterstützung und ihre heiteren 'Mahlzeiten-Runden'. Der leidgeplagten Isotopen-Beauftragten Frau Dr. Belkner erneut ein etwas schuldbewusstes, aber um so herzlicheres Dankeschön, verbunden mit dem Wunsch, dass sich keine weiteren Havarien ereignen mögen. Den 'administrativen Damen' Frau Dr. Stroh, Frau Kretschmer, Frau Glaubitz und Frau Höcke ein herzliches Dankeschön für ihr 'Wirken im Hintergrund'. Ganz besonders möchte ich mich für ihre eifrige Hilfe bei unserer tatkräftigen Frau Hoffmann bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei all denen herzlichst bedanken, die ich in den letzten anstrengenden Monaten vernachlässigt habe, die aber dennoch für einen 'emotionalen Ausgleich' sorgten und die durch ihre Unterstützung meiner Person sowie durch ihr Verständnis für meine Arbeit grundlegend zum Gelingen beigetragen haben: Jürgen Sauermann, meiner Familie und den 'Sauermännern', erneut Carola mit Frank und Bjarne (Danke für die Donnerstage!), bei Tine, 'Zebra' Manja, Birgit & Markus, 'Frau Molt' Ruth und allen 'namenlosen' anderen.

DANKE !

Erklärung

Hiermit versichere ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, 04.10.2004

Urheberrechtshinweis

Inzwischen wurden Passagen dieser Dissertation (Teile der Abbildungen 13, 18, 19, 21, 22, 24, 29 und 39) veröffentlicht in

Heink S, Ludwig D, Kloetzel PM, Kruger E (2005) IFN γ -induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. Proc Natl Acad Sci USA. 102 (26): 9241-6.

© 2005 by The National Academy of Science of the USA.

copyright notice

In the meantime, passages of this thesis (parts of the figures 13, 18, 19, 21, 22, 24, 29 and 39) have been published in

Heink S, Ludwig D, Kloetzel PM, Kruger E (2005) IFN γ -induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. Proc Natl Acad Sci USA. 102 (26): 9241-6.

© 2005 by The National Academy of Science of the USA.

Jena, 25.07.2005